Zur Biosynthese des Ricinins

Eine Untersuchung zur Bildung des Pyridinringsystems in höheren Pflanzen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gerlinde Boeckh-Behrens

aus

Berlin

1960

6619

ZUR BIOSYNTHESE DES RICININS

Eine Untersuchung zur Bildung des Pyridinringsystems
in höheren Pflanzen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der

Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von

Gerlinde Boeckh-Behrens

aus

Berlin

1960

22/60

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1960

Dekan: Prof. Dr. Freiherr v. Engelhardt
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Butenandt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Weitzel

Druck: Steinbauer u. Hagemann, München 2

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Adolf BUTENANDT in der Zeit zwischen Mai 1956 und Sommer 1959 im Max-Planck-Institut für Biochemie zuerst in Tübingen, später in München, durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Adolf BUTENANDT, danke ich sehr herzlich für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegen gebracht hat.

Herrn Dr. Ulrich SCHIEDT, der am 31.12.57 verstorben ist, bin ich für die Überlassung des Themas und für zahlreiche Anregungen ausserordentlich zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Erich HECKER verdanke ich wertvolle Ratschläge und Diskussionen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549606_0036

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung und Ziel der Arbeit 1

II. Studium der Bildung des Ricinins

A. Aufzucht und Wachstumsstadien der Keimpflanzen 4

B. Untersuchung des Orts der Alkaloidbiogenese und Applikation möglicher Vorstufen des Ricinins 7

C. Der chemische Abbau des Ricinins 10

1. Die Reaktionsschritte 11

2. Prüfung und rechnerische Auswertung des Verfahrens 13

D. Biogenetische Vorstufen des Ricinins 23

1. Lysin-Pipecolinsäure 23

2. Glutaminsäure-Glutamin 24

3. Asparaginsäure 24

4. Acetat 25

5. C_1-Verbindungen 25

a) Formiat 25

b) Cyanid 25

c) Bicarbonat 26

E. Diskussion der Ergebnisse in Bezug auf die Biosynthese des Ricinins 26

III. Beschreibung der Versuche

A. Versuche an Keimpflanzen 32

1. Hydrokultur der Versuchsobjekte 32

2. Ricininbestimmungen 33

a) in der Nährlösung 33

b) in Homogenaten 33

c) in Keimlingen nach Pipecolinsäure-Injektion 34

3. Untersuchung der freien Aminosäuren 35

a) papierchromatographisch 35

b) mit Hilfe der DNP-Methode 36

c) über Darstellung der Nitrosamine 37

B. Auswertung der Isotopen-Messergebnisse 38

1. Ermittlung der Einbauraten 38

2. Bestimmung der molspezif. Aktivitäten 39

a) Methode 39

b) Ermittlung des Absorptionskoeffizienten 40

c) Umrechnung der Impulszählungen auf Aktivitäten bei "unendlich dünner Schicht" 43

3. Berechnung der prozentualen Anteile der Aktivitäten der einzelnen C-Atome 44

Seite

C. Die Reaktionen des Ricinin-Abbauverfahrens 45
Abspaltung der O-Methylgruppe (Reaktion 1 a/b) 45
Abspaltung der Nitrilgruppe (Reaktion 2) 45
Hydrierung der Ricininsäure (Reaktion 3) 46
Oxydative Ringöffnung (Reaktion 4 a/b) 46
Überführung von N-Methyl-β-alanin in Trimethylamin und Acrylsäure (Reaktion 5) 47
Hydrierung der Acrylsäure (Reaktion 6) 48
Abbau der Propionsäure nach PHARES (Reaktion 7-9) . . . 48
Methylierung des Methylamins (Reaktion 10) 48
D. Versuche zur Synthese und zum kontrollierten Abbau von Ricinin und Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C] 49
E. Versuche mit radioaktiven Ricininvorstufen und Abbau der Ricinin-[^{14}C] - Präparate 54
1. Lysin-[^{14}C] 54
2. Glutaminsäure-[1-^{14}C] 55
3. Glutaminsäure-[2-^{14}C] 55
4. Asparaginsäure-[3-^{14}C] 56
5. Acetat-[1-^{14}C] 57
a) Injektion 57
b) Verfütterung 57
6. Acetat-[2-^{14}C] 58
7. Formiat-[^{14}C] 58
8. Cyanid-[^{14}C] 58
9. Bicarbonat-[^{14}C] 59

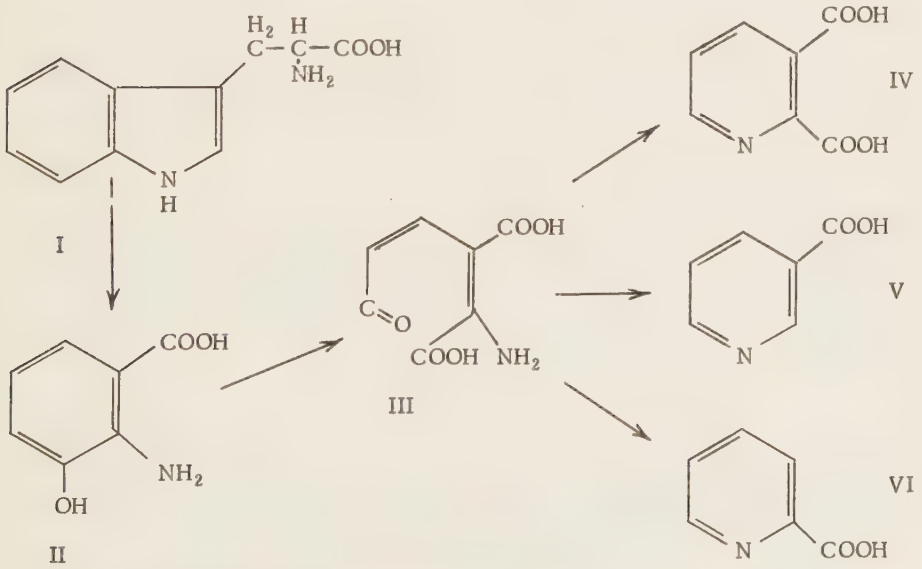
IV. Zusammenfassung

V. Anhang: Tabellen - Formelschema II - Abb. 7

I. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

In den letzten Jahren sind unsre Kenntnisse über die Biosynthese des Benzolrings wesentlich bereichert worden[1]. Dagegen ist unser Wissen über die Entstehungsmöglichkeiten von Pyridinderivaten in den Organismen bisher dürftig. Am besten untersucht ist die Genese einiger Pyridin-carbonsäuren in Pilzen und Säugetierorganen[2]: 3-Hydroxy-anthranilsäure (II), die dem Stoffwechsel des Tryptophans (I) entstammt, erfährt eine oxydative Ringöffnung. Es resultiert der α-Amino-β-carboxy-muconsäurehalbaldehyd-(ω) III[3], der nach cis-trans-Umlagerung an seiner α,β-Doppelbindung den Pyridinring zu schliessen vermag. Je nach Decarboxylierungsgrad können auf diesem Wege Chinolinsäure (IV), Nicotinsäure (V) oder Picolinsäure (VI) entstehen (Schema I).

Schema I Der biogenetische Zusammenhang zwischen 3-Hydroxy-anthranilsäure und Pyridin-carbonsäuren in Pilzen und Säugetierorganen.



[1] Zusammenfassung in Amino Acid Metabolism, Baltimore (1955), CH. GILVARG S. 812, D. B. SPRINSON S. 817, E. B. KALAN und P. R. SRINIVASAN S. 826.

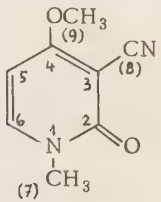
[2] Zusammenfassung ebenda, C. YANOFSKY S. 930.
O. WISS, H. SIMMER und H. PETERS, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 221 (1956).
L. V. HANKES und L. M. HENDERSON, J. Biol. Chem. 225, 349 (1957)

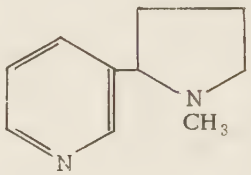
[3] E. KUSS, Dissertation Univ. München 1959.

Auf eine mögliche de-novo-Synthese des Pyridinrings weisen Versuche von ORTEGA und BROWN[4] an Escherichia coli hin. Sie fanden, dass Bernsteinsäure-[2.3-^{14}C] und Glycerin-[1.3-^{14}C] in Nicotinsäure eingebaut werden, nicht jedoch Brenztraubensäure-[2-^{14}C].

Bei höheren Pflanzen können Untersuchungen der Biogenese geeigneter Alkaloide Einblick in die Bildungsweise des Pyridinrings geben. LEETE und LEITZ[5] nehmen an, dass das Alkaloid Ricinin (VII) direkt aus Niacin entstehen kann. Sie verfütterten Nicotinsäure-[carboxyl-^{14}C] an Ricinuspflanzen und konnten radioaktives Ricinin isolieren, das das Kohlenstoffisotop nur in der Nitrilgruppe (C-8) aufwies. Die Autoren formulieren eine Hypothese der Ricininbildung, die aber keinerlei Aufschluss über die Biogenese des Pyridinrings liefert. DAWSON[6] hält es nach Versuchen an Nicotiana-Wurzeln mit ^{3}H- oder ^{14}C-markierter Nicotinsäure für sicher, dass diese Verbindung eine direkte Vorstufe für Nicotin (VIII) darstellt.

VII





VIII

Aber nicht nur Tryptophan-[3-^{14}C][7], sondern auch im Benzolring markiertes Tryptophan[8] oder Anthranilsäure-[1-^{14}C][9] haben sich als unwirksam in der Nicotinbiogenese erwiesen. Auch an Bohnenkeimlingen oder -blättern sind Tryptophan-[3-^{14}C][10] oder 3-Hydroxy-anthranilsäure[11] keine Vorstufen von Trigonellin, dem Betain der Nicotinsäure.

---

4 M.V.ORTEGA und G.M.BROWN, J.Amer.chem.Soc. 81, 4437 (1959).
5 E.LEETE und F.H.B.LEITZ, Chem. and Ind. 48, 1572 (1957).
6 R.F.DAWSON, J.Amer.chem.Soc. 78, 2645 (1956).
7 K.BOWDEN, Nature 172, 768 (1953).
8 E.LEETE, Chem. and Ind. , 1270 (1957).
9 J.GRIMSHAW and MARION, L., Nature 181, 112 (1958).
10 E.LEETE, L.MARION und I.D.SPENSER, Cand.J.Chem. 33, 405 (1955).
11 S.ARONOFF, Plant.Physiol. 31, 355 (1956).

Die widersprechenden Meinungen über die Biogenese des Pyridinrings in höheren Pflanzen waren der Anlass zu Untersuchungen über die Bildung des Alkaloids Ricinin, die am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt werden.

Ricinin ist das einzige Alkaloid der Euphorbiacee Ricinus und als einfaches Pyridonderivat für solche Untersuchungen besonders geeignet.

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einbau von ausgewählten ^{14}C-markierten Verbindungen in das Ricinin zu studieren.

---

[12] D. GINSBURG und H. TAMIR ref. Internat. Kongr. für Biochem., Wien 1958;
[13] D. GINSBURG und H. TAMIR, J. Chem. Soc. (London) 1959, 2921.

II. STUDIUM DER BILDUNG DES RICININS

A. Aufzucht und Wachstums-Stadien der Keimpflanzen

Samen von Ricinus communis L. werden in wassergesättigtem Sägemehl bei Dunkelheit zur Keimung gebracht. Unter den angegebenen Bedingungen erhält man aus etwa der Hälfte der Samen gleich grosse und gleich starke Keimpflanzen, die sehr günstige Versuchsobjekte darstellen. Etwa am 3. Tag der Keimung haben die Pflanzen eine 3cm lange primäre Wurzel und im Alter von etwa 6 Tagen lassen sie sich bequem ins Endosperm, in den Raum zwischen Keimblättern und Nährgewebe, injizieren. Die Wachstumsstadien erläutert Abb. 1.

Für Injektionsversuche werden die Keimlinge vor dem Auswachsen der Nebenwurzeln aus dem Trägermaterial entnommen und in Kulturgefässe, die eine wässrige Lösung von Mineralsalzen enthalten, übergeführt. Man setzt sie in netzbespannte Drahtschlingen (Abb. 2), in denen man sie leicht und ohne Beschädigung handhaben kann.

Die Applikation radioaktiver Verbindungen durch Injektion hat bedeutende Vorteile gegenüber der Verabreichung solcher Verbindungen mit der Nährlösung: Man umgeht das Resorptionsproblem der Wurzeln sowie Fehlerquellen, die sich durch Pilz- und Bakterienwachstum in der Nährlösung ergeben können. Ricininsäure hemmt z.B. noch in einer Verdünnung von 1:1500 die Ausbildung des Wurzelsystems, während sie injiziert keine Schädigung der Keimpflanzen hervorruft. Kennt man Ort und Zeitpunkt der zu untersuchenden Biogenese, so kann man das Abwandern der markierten Verbindung in andere Stoffwechselprozesse auf ein Mindestmass beschränken und erhält dadurch gute Einbauraten. Mit Acetat-[1-^{14}C], das zum Vergleich der beiden Applikationsmethoden Ricinuskeimlingen einerseits mit der Nährlösung, andererseits durch Injektion verabreicht worden ist, erzielte man bei letzterer Methode eine um den Faktor 10 höhere Einbaurate (Tab. I)[x].

Tab. I Applikation von Acetat-[1-^{14}C] an Ricinuskeimlinge

Art der Applikation	appliz. Menge total Aktiv. Imp./Min.	isoliertes Ricinin		
		spezif. Akt. Imp./Min. / mg	total Akt. Imp./Min.	Einbaurate % +)
mit Nährlösung	$35 \cdot 10^6$	372	$0.02 \cdot 10^6$	0.06
durch Injektion	$119 \cdot 10^6$	2690	$0.6 \cdot 10^6$	0.5

+) % der injizierten Aktivitäten

[x] Von U. SCHIEDT (unveröff.) ausgeführte Versuche sind in der vorliegenden Arbeit mit diesem Stern (x) gekennzeichnet.

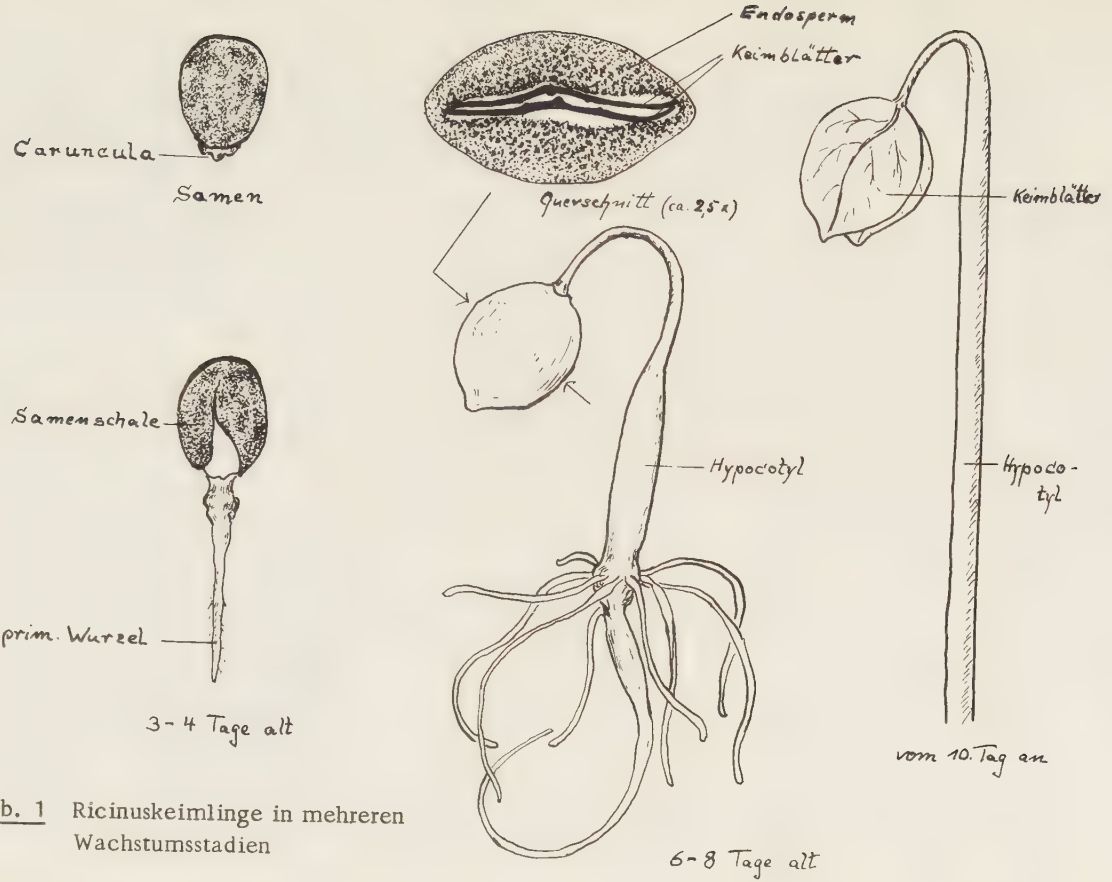
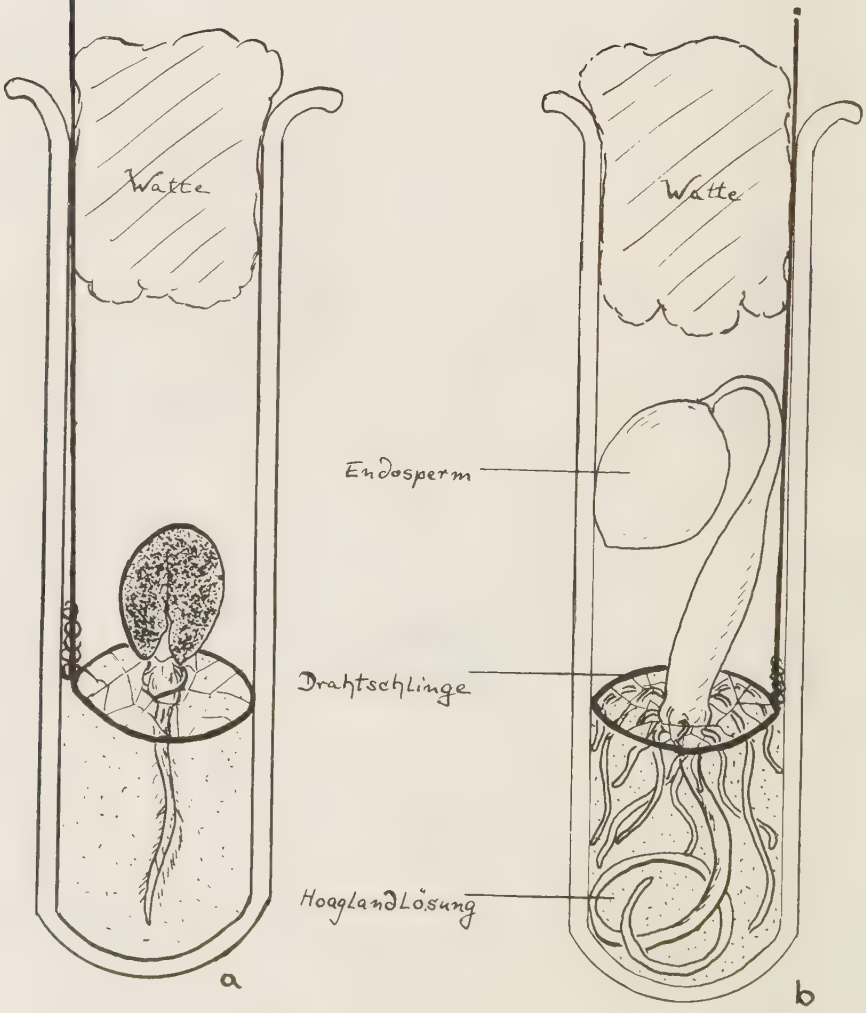


Abb. 1 Ricinuskeimlinge in mehreren Wachstumsstadien

Abb. 2 Kulturröhren für Ricinuskeimpflanzen
a frisch besetzt b injektionsreif



B. Untersuchung des Orts der Alkaloid-Biogenese und Applikation möglicher Ricininvorstufen

Aus Arbeiten von U. SCHIEDT [x] geht hervor, dass der Riciningehalt der Keimpflanzen zwischen dem 5. und 11. Tag der Keimung stark zunimmt und, dass dieser Anstieg der Alkaloidmenge etwa am 13. Tag mit dem vollkommenen Verbrauch des Nährgewebes zum Stillstand kommt (Abb. 3). Die Kurve zeigt, dass eine Pflanze zu diesem Zeitpunkt fast 6 mg Ricinin - etwa 3% ihres Trockengewichts - aufweist, während ein Samenkorn ohne Schale etwa 0.27 mg Ricinin - 0.09% des Trockengewichts - enthält. Auch nach vorzeitiger Entfernung des Endosperms steigt der Riciningehalt im genannten Zeitraum stark an [x]. Durch die Wurzel werden zwischen dem 6. und 16. Tag der Keimung insgesamt nur 27 γ Ricinin pro Pflanze in die Nährlösung ausgeschieden.

Die Alkaloidbildung erfolgt bei Keimlingen in 2 Phasen, von denen die erste im Zusammenhang mit der Mobilisierung der Reservestoffe des Samens steht. Erst in einem späteren Entwicklungsstadium ist z.B. beim Nicotiana-Keimling [14] die Wurzel als Bildungsort der Alkaloide anzusehen.

Es gelingt auch im Gewebebrei aus Teilen der Ricinuskeimpflanzen eine Ricininzunahme zu beobachten. Nach einigen Stunden ist der Anstieg des Riciningehalts im Homogenat der Keimblätter genauso stark, wie bei Keimblättern in vivo (vergleiche Kurve Abb. 4). Im Wurzelbrei wird kein Ricinin gefunden und im Versuch mit Nährgewebe allein zeigt sich nur manchmal eine Ricininzunahme.

Man kann danach annehmen, dass das Ricinin in den Keimlingen vor Entfaltung der Cotyledonen in letzteren entsteht. Diese Kenntnis ermöglicht es, durch Injektion isotopenmarkierte Verbindungen an den Syntheseort zu bringen, um ihren Einbau in das Ricinin zu verfolgen. Danach lässt man die Versuchspflanzen im Dunkeln wachsen, bis sie ihr Nährgewebe vollständig aufgebraucht haben - etwa am 20. Tag der Keimung. Anschliessend isoliert man aus ihnen das Ricinin und ermittelt seine Radioaktivität. Die im Rahmen dieser Arbeit applizierten Verbindungen und die Radioaktivität des gebildeten Ricinins in Prozenten der injizierten Aktivität (Einbaurate) sind in Abb. 5 angegeben.

Die Injektionen wurden z.T. von U. SCHIEDT und A. DELLUVA durchgeführt, den Werten von Acetat-[^{14}C], Formiat-[^{14}C] und Glutaminsäure-[1-^{14}C] liegen die Isotopenmessergebnisse von U. SCHIEDT zu Grunde.

---

[14] H. SCHMID, Ber. schweiz. bot. Ges. 58, 5 (1948).
H. SCHMID, und M. SERRANO Experientia (Basel) 6, 311 (1948).

Abb. 3 Ricininbildung und Verbrauch des Endosperms während der Keimung x)
(jeder Punkt ist ein Mittelwert von 10 Pflanzen)

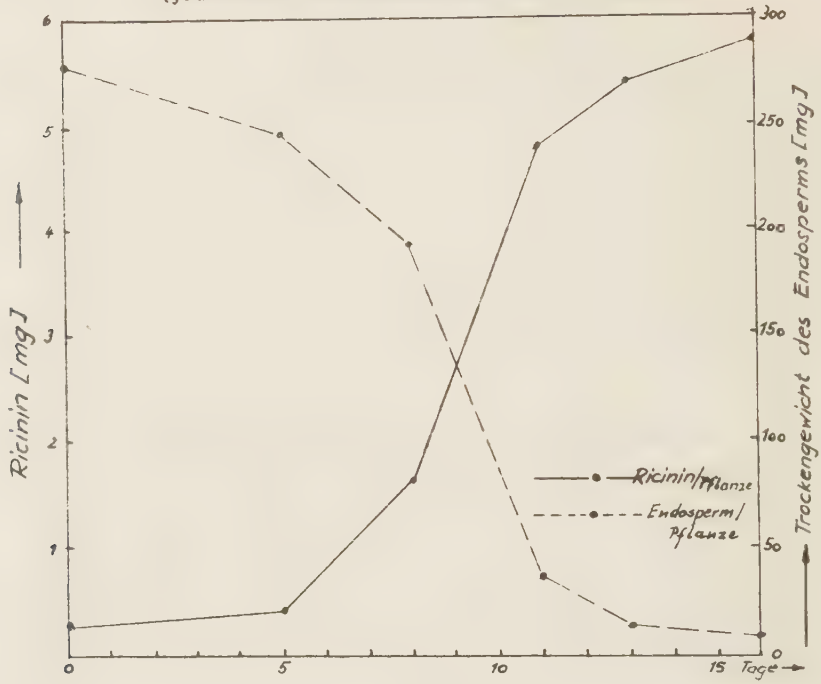


Abb. 4 Ricininbildung in Cotyledonen einer Pflanze in vivo x)
(Mittelwerte von je 10 Pflanzen)

*: Ricininbestimmungen
im Homogenat der Keimbl.

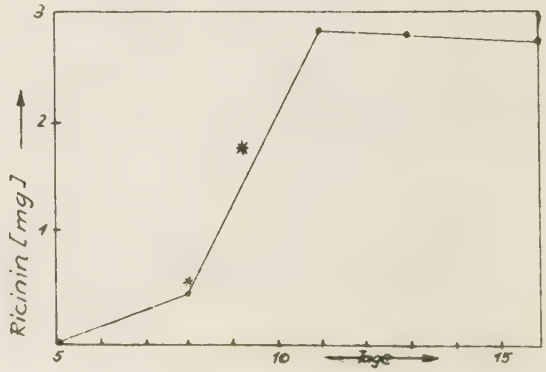
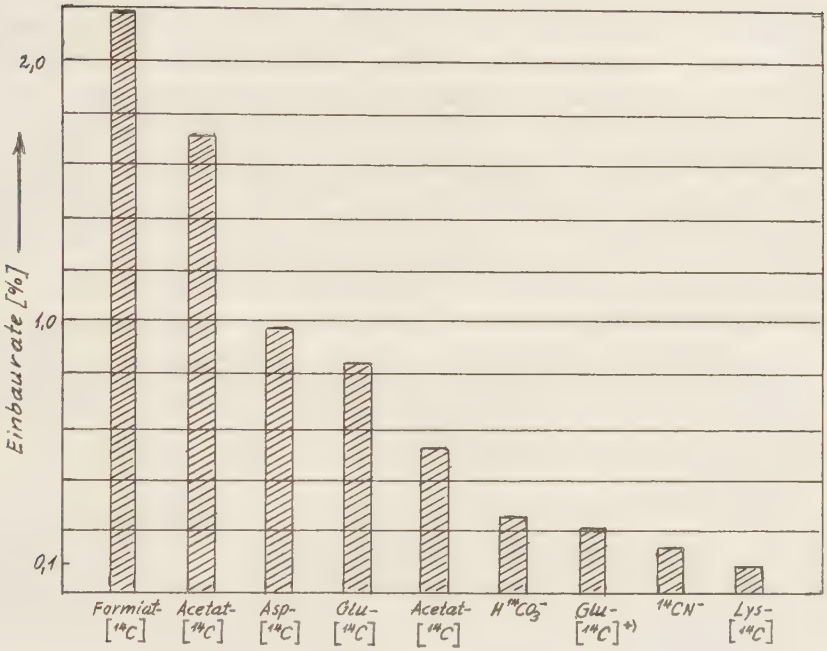


Abb. 5 Einbau von ^{14}C-markierten Verbindungen in Ricinin. Injektionsversuche an Keimpflanzen



+) mit der Nährlösung verabreicht.

Man ersieht aus Abb. 5, dass in der beschriebenen Versuchsanordnung Formiat-[^{14}C] am besten, Lysin-[^{14}-C] dagegen am schlechtesten zur Biogenese des Ricinins ausgenutzt wird. Aus diesen Befunden allein kann jedoch nicht geschlossen werden, dass z.B. Acetat eine direkte Vorstufe des Ricinins ist. Es muss vielmehr für jede einzelne Verbindung untersucht werden, in welchen C-Atomen des damit entstandenen Ricininmoleküls die Radioaktivität enthalten ist. Die Kenntnis der Einbaurate und der Aktivitätsverteilung können dann Schlüsse auf die Bildungsweise des Ricinins zulassen.

Die Verteilung der Aktivität im Ricinin wird durch einen stufenweisen chemischen Abbau ermittelt.

C. Der chemische Abbau des Ricinins

Das hier beschriebene Verfahren gestattet, 300-500 mg Ricinin auf die Verteilung des ^{14}C im Molekül zu untersuchen. Dabei werden die Kohlenstoffatome 4, 5, 8 und 9 +) in Form von Kohlendioxyd erhalten, dessen Radioaktivität nach Überführung in Bariumcarbonat gemessen wird. Die Kohlenstoffatome 2 und 3 gehen aus dem Abbau als Oxalat hervor. Dieses liefert nach Nassverbrennung[15] ebenfalls Kohlendioxyd. Allerdings gewinnt man hierbei nur die Summe der Aktivitäten der beiden Kohlenstoffatome. Die Lage des Aktivitätsschwerpunkts im Oxalat lässt sich aber durch das im Abschnitt C, 2 erläuterte rechnerische Verfahren hinreichend genau festlegen. Die Kohlenstoffatome 6 und 7 fallen als Trimethylamin an, das, gefällt als Tetramethylammonium-Reineckat, zur Messung der Aktivität gelangt.

Das Verfahren ist in wesentlichen Teilen von U. SCHIEDT ausgearbeitet worden. Die Hydrierung des Pyridonrings und die im Zuge der Ringöffnung ablaufenden Folgereaktionen bedurften weiterer Untersuchungen.

1. Die Reaktionsschritte

Abspaltung der O-Methylgruppe (Reaktion 1a/b): TUSON[16], der 1864 das Ricinin in wässrigen Extrakten von Ricinussamen fand, stellte fest, dass "es sich um den Methylester einer Säure handelt, den man mit Pottasche leicht verseifen kann". Andere Autoren[17,18] haben zur Hydrolyse konz. Kalilauge, $Ba(OH)_2$-Lösung oder rauchende Salzsäure verwendet.

Diese überraschende Spaltbarkeit der Methyläther-Gruppierung ist verständlich, wenn man die Ricininsäure (IX) als vinyloge Carbonsäure auffasst. Dem entspricht auch die später noch zu beschreibende Methylierbarkeit mit Diazomethan.

Man spaltet die O-Methylgruppe durch etwa einstündiges Kochen mit 1n NaOH ab. Die durch Ansäuern freigesetzte Ricininsäure (IX) fällt in feinen Nadeln aus. Schmp. 296-298°C, Ausbeute über 90% d. Th.

+) Schema II, am Ende der Arbeit.

15 Alle Verbrennungen wurden nach der Methode von CLAYCOMB u. Mitarb. ausgeführt: C.K. CLAYCOMB, T.T. HUTCHENS und J.T. VAN BRUGGEN, Nucleonics 7, 38 (1950).

16 R.V. TUSON, J. Amer. chem. Soc. 17, 195 (1864).

17 M. DUBECK und S. KIRKWOOD, J. Biol. Chem. 199, 307 (1952).

18 B. BÖTTCHER, Ber. dtsch. chem. Ges. 51, 673 (1918).

Das abdestillierte Methanol wird mit Jodat/Dichromat/H_2SO_4/H_3PO_4 in 80-90 proz. Ausbeute zu CO_2 oxydiert.

Eliminierung von Blausäure (Reaktion 2): Schon BÖTTCHER[18] hatte beschrieben, dass durch Einwirkung von Chromsäure auf Ricinin eine äquivalente Menge Blausäure in Freiheit gesetzt wird.

Wendet man diese Methode auf Ricininsäure (IX) an, so kann man bis zu 88% der zu erwartenden Menge Silbercyanid erhalten. Es gelang jedoch U. SCHIEDT nicht, die andere Komponente, vermutlich 1-Methyl-4-methoxy-pyridon-(2), in kristallisierter Form zu fassen. Das Silbercyanid fällt man in Gegenwart gereinigter Kieselgur und erleichtert so das Handhaben der kleinen Substanzmengen. Es wird mit 90 proz. Ausbeute zu CO_2 verbrannt.

Abbau des Ringsystems: In Arbeiten von WINTERSTEIN und Mitarbeitern[19] ist beschrieben, dass bei der Oxydation von Ricinin mit Bariumpermanganat in alkalischer Lösung Oxalsäure und Bernsteinsäure entstehen. Dieses Ergebnis konnte U. SCHIEDT trotz zahlreicher Versuche[x] nicht reproduzieren. Er fand papierchromatographisch in solchen Ansätzen keine Bernsteinsäure und nur ganz wenig Oxalsäure. Deshalb wurde die oxydative Ringöffnung nach vorhergehender partieller Hydrierung der Ricininsäure vorgenommen (Schema II).

Hydrierung (Reaktion 3): Ricininsäure (IX) kann nach BÖTTCHER[18] mit Natriumamalgam zu Dihydro-ricininsr. (X) reduziert werden. WINTERSTEIN[19] versuchte, Ricinin auf anderem Wege zu hydrieren. Dabei führte Zinkstaubdestillation zu Pyridin; Zn/HCl und Na/Alkohol waren wirkungslos. Bei katalytischer Hydrierung mit Platin in HCl oder Eisessig wurde zwar Wasserstoff aufgenommen, jedoch nicht die berechnete Menge; auch wurden keinerlei isolierbare Endprodukte erhalten. MARION[20] schreibt, dass bei katalytischer Hydrierung mit Platin aus Ricinin Tetrahydro-ricinin-hydrochlorid vom Schmp. 212-215° entstünde. Dieses wäre aber für die beabsichtigte Ringöffnung nicht geeignet.

Die Natriumamalgam-Methode erschien daher als die aussichtsreichste. Die Reaktionsbedingungen wurden in zahlreichen Versuchen ausgearbeitet.

Es erweist sich für vollständige Umsetzung der Ausgangssubstanz als notwendig, das Reduktionspotential so hoch wie möglich zu halten. Hydrierung in nur schwach alkalischer ($p_H < 9$) oder über 1n Lösung, sowie niedrige

---

19 C. WINTERSTEIN, J. KELLER und A.B. WEINHAGEN, Arch. Pharm., Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 255, 513 (1917).

20 L. MARION in "The Alkaloids", New York 1950, S. 206.

Temperatur (0°) oder verkürzte Reaktionszeit (2 Stdn.) haben schlechte Ausbeuten zur Folge.

Der Nachweis vollständiger Reduktion kann leicht mit Hilfe der Papierchromatographie erfolgen. Die Reduktion führt zu keinem einheitlichen Produkt: Man erhält 3 Verbindungen, die sich durch ihre Löslichkeitseigenschaften, Schmelzpunkte, Wanderungsgeschwindigkeiten in Papierchromatogramm und Elektropherogramm, nicht aber in ihren Dissoziationskonstanten und fast nicht in ihren UV-Spektren unterscheiden. Die Substanzen werden auf dem Papierchromatogramm im durchfallenden UV-Licht als dunkle Flecken erkannt. Sie haben im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) folgende R_F-Werte:

Ricininsäure (IX):	$R_F = 0.65$
Hydrierungsprodukt 1:	$R_F = 0.47$
Hydrierungsprodukt 2a:	$R_F = 0.28$
Hydrierungsprodukt 2b:	$R_F = 0.02$

Die Substanz mit $R_F = 0.47$ ist das Hauptprodukt der Hydrierung, die 5.6-Dihydro-ricininsäure (X), (35-45% d.Th.). Ihre Analysendaten stimmen mit den für Dihydro-ricininsäure berechneten überein. Die Lage der verbliebenen Doppelbindung folgt aus den unten beschriebenen weiteren Abbauschritten und wird auch dadurch gestützt, dass die UV-Spektren von Ricininsäure und dieser Dihydro-ricininsäure einander sehr ähnlich sind. Dies kann nur so gedeutet werden, dass in beiden Verbindungen die in Konjugation zur Nitril- und zur C=O-Gruppe stehende Doppelbindung noch vorhanden ist.

Die Hydrierungsprodukte 2a und 2b wurden nicht weiter untersucht.

Oxydative Ringöffnung (Reaktion 4a/b): Die 5.6-Dihydro-ricininsäure (X) wird durch Oxydation mit Permanganat in schwach alkalischer Lösung (p_H 8.5-8.7) bei 0° aufgespalten. Dabei entsteht eine ölige Substanz, der U. SCHIEDT nach ihrem chemischen und spektralen Verhalten die Konstitution XI zuwies. Beim Kochen dieses Nitrilamids mit 6-n-HCl wird CO_2 freigesetzt. Da tertiäre Säureamide oft schwer verseifbar sind[21], nahm man zunächst an, dass das CO_2 allein aus C-8 stammt. Dies trifft aber, wie aus Versuchen mit synthetischer Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C] hervorgeht, nicht zu. Auf die Problematik dieses Abbauschrittes wird in Abschnitt C, 2 näher eingegangen.

Neben Kohlendioxyd erhält man in Reaktion 4a/b ein Gemisch von Oxalat und N-Methyl-β-alanin (XII). Diese beiden Verbindungen werden an einem H^+-Ionenaustauscher voneinander getrennt, die Oxalsäure als Calciumsalz gefällt und schliesslich nass verbrannt.

---

[21] HOUBEN-WEYL, Bd. III, Sauerstoffverbindungen, 4. Auflg., Stuttgart 1952, S. 432.

Abbau von N-Methyl-β-alanin (Reaktionen 5-10): Dieses wird einer erschöpfenden Methylierung mit Dimethylsulfat unterworfen. Das resultierende Homobetain zerfällt leicht in Trimethylamin und Acrylsäure. Da man mit einem Überschuss an Methylierungsreagens arbeitet, wird das Trimethylamin im gleichen Ansatz in das Tetramethylammoniumion übergeführt. Durch Wasserdampfdestillation kann die Acrylsäure von dem nicht flüchtigen Ammoniumsalz abgetrennt werden (Ausbeute 80% d.Th., bezogen auf N-Methyl-β-alanin). Das Tetramethylammoniumion wird als Reineckat gefällt und gelangt als solches zur Radioaktivitätsmessung, denn weder das Reineckat, noch Tetramethylammoniumchlorid liessen sich quantitativ zu CO_2 verbrennen.

Die Acrylsäure wird katalytisch zu Propionsäure hydriert und das Natriumpropionat einem SCHMIDT-Abbau in der Modifikation nach PHARES [22] unterworfen. Das dabei neben CO_2 auftretende Äthylamin wird in alkalischer Lösung mit Permanganat zu Essigsäure oxydiert, die erneut nach SCHMIDT zu CO_2 und Methylamin abgebaut wird. Letzteres fällt man nach Permethylierung als Reineckat.

Nach Abschluss des beschriebenen Abbauverfahrens wurde von GINSBURG [12,13] ein Ricininabbau veröffentlicht, der auf einer Spaltung des Rings mit Ozon beruht.

2. Überprüfung und rechnerische Auswertung des Verfahrens

Zur Überprüfung des Abbauverfahrens wurde von U. SCHIEDT [X] Ricininsäure-[2.4-^{14}C] nach dem Verfahren von SCHRÖTER [23] aus Cyanessigsäure-[1-^{14}C] dargestellt.

Nach SCHRÖTER [23] wird aus Cyanacetylchlorid 6-Chlor-norricinin (XIII) und aus diesem durch Behandlung mit Zinkstaub und Schwefelsäure Norricinin (XIV) erhalten (Schema III). Norricinin wird mit Dimethylsulfat zu Ricininsäure (IX) methyliert. Letztere kann nach eigenen Versuchen in 82proz. Ausbeute mit Diazomethan zu Ricinin umgesetzt werden.

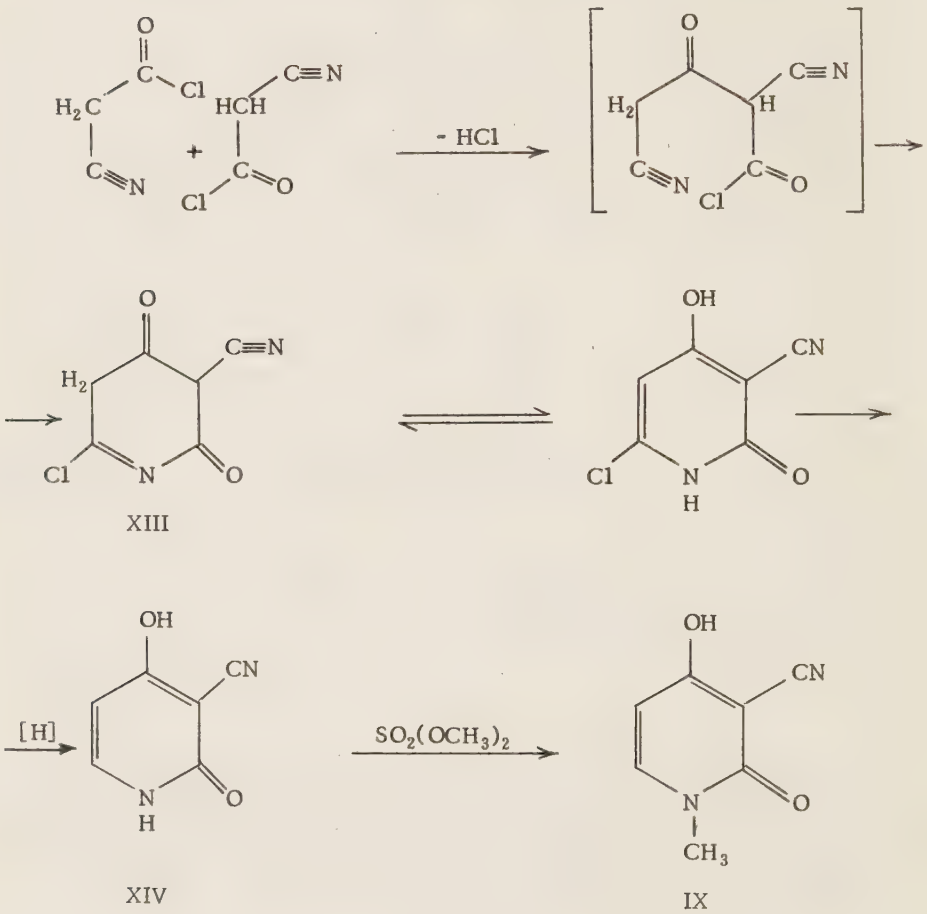
Das rohe Ricinin-[2.4-^{14}C]-Präparat enthielt neben Ricininsäure als einzige radioaktive Substanz Spuren von Norricinin, wie die Aktivitätsverteilung auf dem Papierchromatogramm zeigt (Abb. 6). Es wurde durch Chromatographie an Al_2O_3 gereinigt.

---

[22] E. F. PHARES, Arch. Biochem. Biophys. 33, 173 (1951).

[23] G. SCHRÖTER, und C. SEIDLER, J., prakt. Chem. (2) 105, 165 (1922).
G. SCHRÖTER, C. SEIDLER, M. SULZBACHER und R. KANITZ,
Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 432 (1932); 71, 671 (1938).

Schema III Darstellung von Ricininsäure nach SCHRÖTER[23]



Die Hydrierung der gereinigten Ricininsäure-[2.4-^{14}C] mit Natriumamalgam in der auf Seite 11 beschriebenen Weise liefert ein Substanzgemisch, in dem sich papierchromatographisch neben Ricininsäure 4 radioaktive Banden nachweisen lassen. Nach wiederholter Hydrierung fanden sich nur noch Spuren von Ricininsäure im Substanzgemisch, aus dem die 5.6-Dihydroricininsäure durch Digerieren der Kristallmasse mit kaltem Methanol herausgelöst wird.

Abb. 6 Papierchromatogramm synthetischer Ricininsäure-[2.4-^{14}C]

Die Oxydation (Reaktion 4a/b) wurde an reiner 5.6-Dihydroricininsäure-[2.4-^{14}C] - verschiedenen Verdünnungsgrades bezüglich ihrer Radioaktivität - in 2 Parallelversuchen, wie auf Seite 12 beschrieben, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tab. II zusammengestellt.

Die Berechnung der in Tab. II angegebenen Prozentzahlen wird analog dem folgenden Beispiel vorgenommen:

Probe I zeigte nach Verbrennung zu CO_2 eine spezifische Aktivität von $183 \cdot 10^5$ Imp./Min.·Mol. Wegen der Verdünnung der Radioaktivität durch das CO_2 aus nicht markierten C-Atomen der Dihydro-ricininsäure, ist für CO_2, das ausschliesslich aus einem der beiden markierten C-Atome stammt, eine spezifische Aktivität von $(183 \cdot 10^5 \cdot 7) : 2 = 640 \cdot 10^5$ Imp./Min.·Mol zu erwarten. Diese ist für die Prozentangaben der Tabelle II gleich 100% gesetzt. Das im Verlauf des Abbaus erhaltene Oxalat hat eine spezifische Aktivität von $244 \cdot 10^5$ Imp./Min.·Mol. Berechnet als CO_2 ergibt sich wegen der Verdünnung durch ein inaktives CO_2: $498 \cdot 10^5$ Imp./Min.·Mol, d.h. 78% der erwarteten Radioaktivität. Entsprechend enthält das beim Abbau freigesetzte CO_2

43% derjenigen Aktivität, die zu erwarten wäre, wenn das ganze CO_2 von einem radioaktiven C-Atom (C-2 bzw. C-4) allein stammen würde.

Tab. II Reaktion 4a/b untersucht an 5.6-Dihydroricininsäure-[2.4-^{14}C]

Probe	Dihydro-ricininsäure Imp./Min. Mol	Oxalat gemessen Imp./Min. Mol	Oxalat ber. als CO_2 Imp./Min. Mol	%	CO_2 gemessen Imp./Min. Mol	%	Summe der Proz. %
I	$183 \cdot 10^5$	$244 \cdot 10^5$	$498 \cdot 10^5$	78	$274 \cdot 10^5$	43	121
II	$228 \cdot 10^5$	$336 \cdot 10^5$	$672 \cdot 10^5$	84	$349 \cdot 10^5$	44	128
Mittelwerte				81		44	125

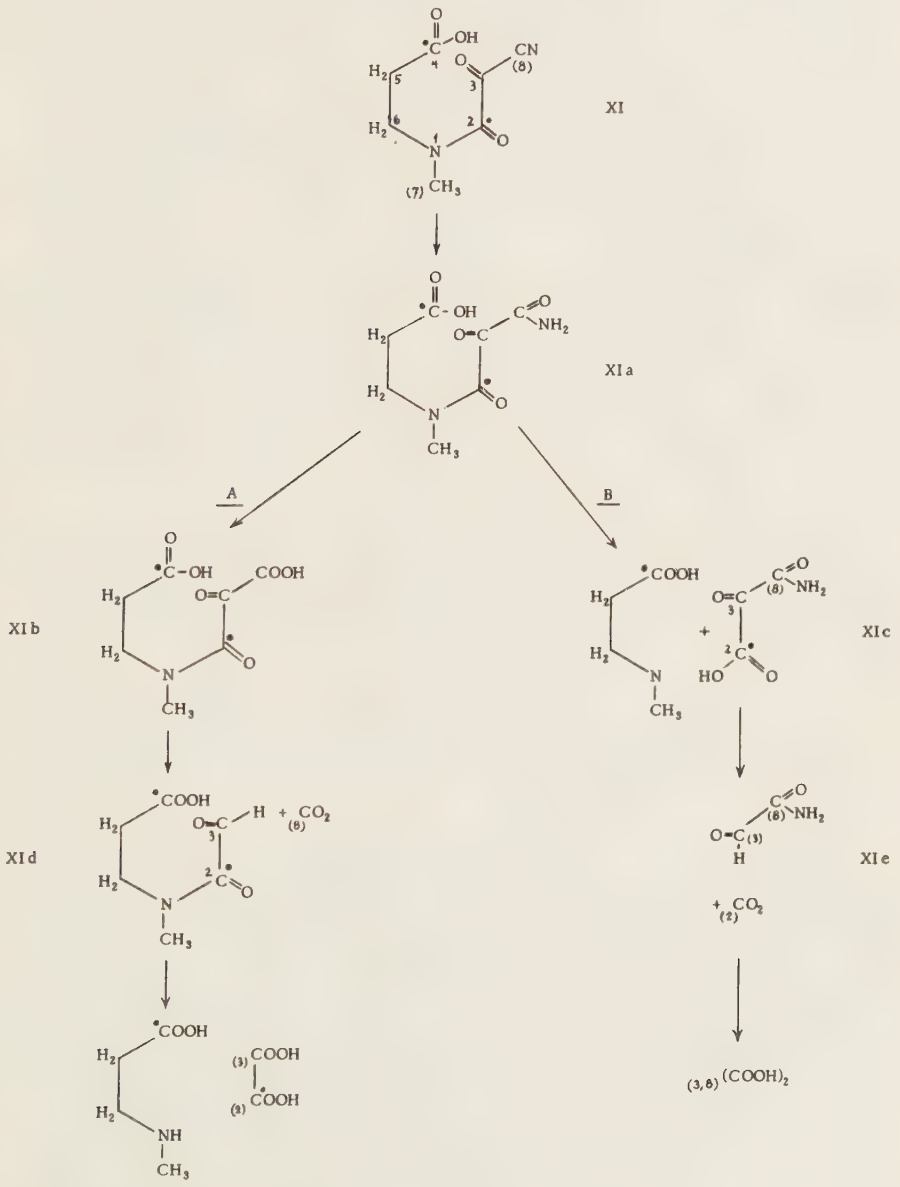
Wie man also der Tab. II entnehmen kann, enthält das beim Abbau gebildete Kohlendioxyd eine beträchtliche Radioaktivität. Das bedeutet, dass es nicht allein aus C-8 stammen kann, welches der Synthese der radioaktiven Dihydro-ricininsäure zufolge keine Radioaktivität enthalten darf - wie durch die Abspaltung der Nitrilgruppe nach Reaktion 2 (vgl. Seite 11) bestätigt wird. Da das neben Kohlendioxyd und Oxalsäure gebildete N-Methyl-β-alanin unter den Bedingungen der Reaktion kein CO_2 abgibt, kann die zunächst unerwartete Radioaktivität des Kohlendioxyds nur aus C-2 der Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C] stammen. Dies ist verständlich, wenn man den Hydrolyseschritt der Eintropfreaktion 4a/b einer genaueren Betrachtung unterzieht.

Aus der Literatur[24] ist bekannt, dass Nitrile in saurem Medium zum zugehörigen Säureamid hydrolysiert werden. Die Spaltung des Amids zur Carbonsäure verläuft viel langsamer. Dementsprechend darf man annehmen, dass auch die Nitrilgruppe des Zwischenprodukts XI zunächst zur Amidstufe hydrolysiert wird. Das Ergebnis dieser Reaktion ist ein Diamid der Mesoxalsäure (XIa, Schema IV), das neben der primären eine tertiäre Amidgruppierung besitzt. Die weitere Spaltung des Zwischenprodukts XI ist daher prinzipiell auf zwei Wegen möglich, die in Schema IV mit A und B bezeichnet sind.

---

[24] GATTERMANN, Praxis des organischen Chemikers, 37. Auflage, Berlin 1956, S. 126 und 371.
HOUBEN-WEYL, Bd. III, Sauerstoffverbindungen, 4. Auflage, Stuttgart 1952, S. 427.

Schema IV Hydrolyse des Zwischenprodukts XI



(die in der Dihydro-ricininsäure markierten C-Atome sind durch Punkte • gekennzeichnet)

Die schneller verlaufende[21] Reaktion A führt über die Spaltung der primären Amidgruppierung zu inaktivem Kohlendioxyd aus C-8 und zu radioaktivem Oxalat, das aus C-2 und C-3 der Dihydro-ricininsäure besteht. Die langsamer verlaufende Reaktion B liefert nach Spaltung der tertiären Amidgruppierung radioaktives Kohlendioxyd aus C-2 und inaktives Oxalat aus C-3 + C-8. Werden die beiden Reaktionswege A und B mit vergleichbaren Geschwindigkeiten durchlaufen, so ist sowohl radioaktives Kohlendioxyd, als auch radioaktives Oxalat zu erwarten. Dem entsprechen die gemessenen und in Tab. II wiedergegebenen Werte der spezif. Aktivitäten der Reaktionsprodukte. Danach werden im Mittel nur 81% der theoretisch aus C-2 zu erwartenden Aktivität im Oxalat gefunden, während die Radioaktivität des gleichzeitig freigesetzten Kohlendioxyds 43% der aus C-2 zu erwartenden Aktivität ausmacht. Das Verhältnis dieser Werte steht im Einklang mit der erwähnten Erfahrung, dass primäre Säureamide (Reaktionsweg A) schneller verseift werden als tertiäre (Reaktionsweg B). Überraschend ist, dass die Summe dieser Prozentzahlen (im Mittel 125%) signifikant höher ist als 100%. Dies zeigt, dass Kohlendioxyd auch noch aus anderen Zwischenstufen, als den Mesoxalsäureamiden XIc und XIC (Schema IV) gebildet wird.

Als zusätzlich CO_2 liefernde Verbindung der Eintropfreaktion 4a/b kommt Glyoxylsäure in Betracht, da N-Methyl-β-alanin mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Aus den Mesoxalsäurehalbamiden XIb und XIc entsteht ein primäres (XIe) und ein tertiäres (XId) Glyoxylsäurehalbamid, die unter den Bedingungen der Hydrolyse Glyoxylsäure liefern (Schema V).

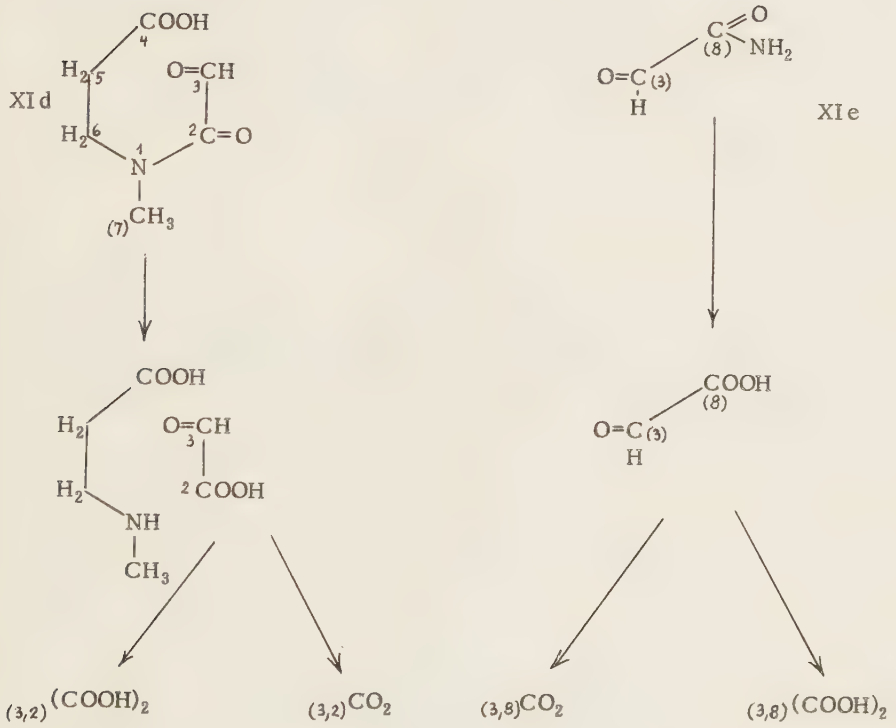
Dass Glyoxylsäure tatsächlich als Zwischenprodukt auftritt, konnte mit Tryptophan nachgewiesen werden. Ausserdem liess sich aus XI beim Hydrolyseansatz ein Dinitrophenylhydrazon in geringer Menge gewinnen, das nach hydrierender Spaltung Glycin ergab.

Aus Glyoxylsäure wird unter den Bedingungen der Reaktion teils Oxalsäure, teils Kohlendioxyd gebildet, wie die Isotopenmessergebnisse zeigen, denn die spezifische Aktivität des in Reaktion 4a/b entstehenden Kohlendioxyds liegt bei 44%, während es bei seiner alleinigen Bildung auf den Wegen A und B nur 19% aufweisen könnte.

Entscheidend für das hier vorliegende Problem des Ricininabbaus ist eine Aussage über die spezifische Aktivität jedes einzelnen C-Atoms. Dieses schien zunächst für die C-Atome 2 und 3 wegen des komplizierten Reaktionsgeschehens innerhalb des Reaktionsschrittes 4a/b in Frage gestellt. Jedoch lässt sich die Radioaktivität jedes dieser beiden C-Atome berechnen, wenn man durch Abbau geeignet markierter Dihydro-ricininsäure-[^{14}C]-Präparate feststellen kann, aus welchen Anteilen an C-2, C-3 und C-8 sich die Endprodukte, Oxalsäure und Kohlendioxyd, der Reaktion 4a/b zusammensetzen. Voraussetzung dafür ist

lediglich, dass man stets unter annähernd gleichen äusseren Bedingungen arbeitet, so dass die Zusammensetzung der Endprodukte in Bezug auf die Herkunft ihrer C-Atome immer dieselbe ist.

Schema V Zerfall der Glyoxylsäurederivate XId und XIe



Aufstellung der Gleichungen: Allgemein ergibt sich die spezifische Aktivität "A" eines Gemisches aus den spezifischen Aktivitäten seiner Komponenten nach folgender Beziehung:

$$(1) \qquad A\left[\frac{\text{Imp./Min.}}{\text{Mol}}\right] = \frac{n_1 A_1 + n_2 A_2 + \ldots n_i A_i}{n_1 + n_2 + \ldots n_i}$$

$$= \frac{n_i A_i}{n_i}$$

Dabei bedeuten A_1, A_2, A_i die spezifischen Aktivitäten der Substanzen 1, 2, i in Imp./Min.·Mol und n_1, n_2, n_i die Anzahl der Mol der Substanzen 1, 2, i im Gemisch.

Wie im vorausgehenden Abschnitt (Tab. II) am Beispiel der Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C] gezeigt wurde, stammt die Oxalsäure zu 81% aus den C-Atomen 2 und 3. Die restlichen 19% müssen deshalb aus C-3 + C-8 hervorgegangen sein. 100 Mol Oxalat setzen sich folglich aus 81 Mol (C-2 + C-3) und 19 Mol (C-3 + C-8) zusammen.

Nach Gleichung (1) erhält man:

$$(2) \qquad A_{Oxalat}\left[\frac{\text{Imp./Min.}}{\text{Mol}}\right] = \frac{81 \cdot A_{2,3} + 19 \cdot A_{3,8}}{100}$$

also ist

$$(3) \qquad A_{2,3} = 1.23\, A_{Oxalat} - 0.23\, A_{3,8}$$

Die spezifischen Aktivitäten $A_{3,8}$ und $A_{2,3}$ können zufolge Gleichung (1) auch beschrieben werden als:

$$(4) \qquad A_{3,8} = \frac{A_3 + A_8}{2}$$

$$(5) \qquad A_{2,3} = \frac{A_2 + A_3}{2}$$

Setzt man (4) und (5) in (3) ein, so ergibt sich:

$$(6) \qquad A_2 = 2.46\, A_{Oxalat} - 1.23\, A_3 - 0.23\, A_8$$

A_8 bedeutet die Aktivität der Nitrilgruppe, die in Reaktion 2 bestimmt wird. Mit $A_8 = A_{CN}$ lautet Gleichung (6):

$$(6a) \qquad A_2 = 2.46\, A_{Oxalat} - 1.23\, A_3 - 0.23\, A_{CN}$$

A_2, A_3, A_8, A_{Oxalat}, A_{CN} und A_{CO_2}: spezifische Aktivitäten des Kohlendioxyds von den C-Atomen 2, 3 und 8, bzw. des Kohlendioxyds aus Oxalat, aus der Nitrilgruppe und die spezifische Aktivität des direkt in Reaktion 4 a/b freigesetzten CO_2.

Da Gleichung (6 a) zwei unbekannte Grössen enthält, ist zu ihrer Auflösung eine weitere Beziehung erforderlich. In diese geht die spezifische Aktivität des Kohlendioxyds aus Reaktion 4 a/b ein. Im vorhergehenden Abschnitt (Tab. II) wurde dargelegt, dass dieses Kohlendioxyd 43% von der Aktivität enthält, die es aufweisen müsste, wenn es vollständig aus C-2 bestünde. 100 Mol CO_2 enthalten danach 43 Mol CO_2 von C-2, - das im untersuchten Beispiel allein radioaktiv war. Die restlichen 57 Mol Kohlendioxyd stammen nun aber nicht allein aus C-8, - wie auch das Schema V deutlich macht -, sondern es ist auch C-3 darin enthalten. Da keine in C-8 synthetisch markierte Dihydro-ricininsäure zur Verfügung stand, musste zur Aufstellung der zweiten Gleichung auf die Abbauergebnisse von "Ricinin - $Na^{14}CN$" zurückgegriffen werden. Die Messergebnisse sind in Tab. III zusammengestellt.

Tab. III Daten aus dem Abbau von "Ricinin - $Na^{14}CN$"

Oxalat		Kohlendioxyd		CN^-	
Imp./Min. / Mol	% d. Akt. d. Ricinins	Imp./Min. / Mol	% d. Akt. d. Ricinins	Imp./Min. / Mol	% d. Akt. d. Ricinins
$23.7 \cdot 10^5$	13	$70.5 \cdot 10^5$	19	$192 \cdot 10^5$	51

Die Prozentangaben beziehen sich auf $376 \cdot 10^5$ = 100%, da die spezifische Aktivität des Ricinins $47 \cdot 10^5$ Imp./Min. · Mol betrug.

Bei Anwendung von Gleichung (6 a) ergibt sich mit den Werten für A_{Oxalat} und A_{CN} aus Tab. III:

$$A_2 + 1.23\, A_3 = 15$$

Danach ist C-2 und C-3 nur unsignifikant markiert, denn A_2 und A_3 zusammen betragen nur etwa 4% der Aktivität des Ricininpräparats.

Unter diesen Umständen berechnet sich, dass das fragliche Kohlendioxyd $109 \cdot 10^5$ Imp./Min. · Mol hätte aufweisen müssen, wenn es zu 43% seiner Gesamtmenge aus C-2 (hier unmarkiert) und zu 57% aus C-8 zusammengesetzt gewesen wäre. Seine praktisch bestimmte Aktivität beträgt demgegenüber nur $70.5 \cdot 10^5$ Imp./Min. · Mol, also 37% der Aktivität von C-8, - die in Reaktion 2 ermittelt worden ist.

Nach diesen Überlegungen muss man annehmen, dass sich 100 Mol Kohlendioxyd (Reaktion 4 a/b) in erster Annäherung zusammensetzen aus: 43 Mol C-2, 37 Mol C-8 und 100-(37+43) = 20 Mol C-3.

Bei Anwendung der Gleichung (1) folgt:

(7) $A_{CO_2} = 0.43\ A_2 + 0.20\ A_3 + 0.37\ A_{CN}$

(8) $A_2 = 2.33\ A_{CO_2} - 0.47\ A_3 - 0.86\ A_{CN}$

aus Gleichung (6 a) und (8) ergibt sich:

(9) $0.76\ A_3 = 2.46\ A_{Oxalat} - 2.33\ A_{CO_2} + 0.63\ A_{CN}$

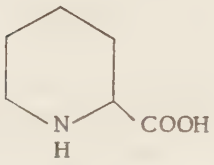
(10) $A_3 = 3.24\ A_{Oxalat} - 3.07\ A_{CO_2} + 0.83\ A_{CN}$

Trotz des recht komplizierten Verlaufs der Reaktion 4 a/b kann nun mit Hilfe von Gleichung (10) und den Messwerten für A_{Oxalat}, A_{CO_2} und A_{CN} eine Aussage über die Aktivität der C-Atome 2 und 3 gemacht werden.

Die Genauigkeit dieser Aussage ist bestimmt durch die Genauigkeit, mit der die Koeffizienten der Gleichungen (6 a) und (8) ermittelt worden sind. Die in Tab. II und III wiedergegebenen Abbauergebnisse, auf denen die hier angegebenen Koeffizienten beruhen, können nicht statistisch gesichert werden, da zu wenig Zahlenmaterial vorliegt. Sie gestatten jedoch, als vorläufige Lösung, den Anteil der Aktivität der C-Atome 2 und 3 an der Aktivität des ganzen Moleküls abzuschätzen, wenn hochmarkiertes Oxalat beim Abbau biosynthetisch markierten Ricinins auftritt.

D. Biogenetische Vorstufen des Ricinins

1. Lysin-Pipecolinsäure



XV

Die biogenetischen Beziehungen zwischen Lysin und Pipecolinsäure sind mehrfach beschrieben worden[25]. In dieser cyclischen Aminosäure (XV) könnte der Pyridinring vorgebildet sein. Auch ein Bildungsweg der Ricinins über 5-Hydroxylysin und 4-Hydroxy-pipecolinsäure wäre denkbar, denn VIRTANEN[26] und andere Autoren[27] fanden letztere, sowie auch 5-Hydroxy-pipecolinsäure in Pflanzenmaterial.

Papierchromatographisch gelang es aber nicht, in Aminosäureextrakten direkt oder nach Injektion der Keimlinge mit DL-Lysin das Vorkommen der Pipecolinsäure oder ihrer Hydroxy-Derivate unter den freien Aminosäuren der Ricinuskeimlinge nachzuweisen. In Papierchromatogrammen könnten die fraglichen Verbindungen eventuell von der viel grösseren Menge an Alanin überdeckt und daher leicht übersehen worden sein. Deshalb wurde im Extrakt aus Stengeln der Keimlinge eine Trennung der Iminosäuren von den α-Aminosäuren über Herstellung ihrer Nitros-Amine vorgenommen. Auch auf diesem Weg konnten jedoch weder Pipecolinsäure noch Hydroxy-pipecolinsäure in Ricinuskeimlingen gefunden werden.

Injektion von DL-Pipecolinsäure hatte eher einen hemmenden, als einen fördernden Einfluss auf die Ricinibildung.

Injektion von uniform markiertem L-Lysin-[^{14}C] bringt radioaktives Ricinin, jedoch ist die ^{14}C-Einbaurate weit kleiner, als die mit anderen Aminosäuren erzielte (Abb. 5). Bei dem Ricininpräparat befindet sich, wie eine Abspaltung der Nitrilgruppe zeigt, etwa 30% der Gesamtaktivität des Moleküls in C-8.

---

[25] Zusammenfassung in Amino Acid Metabolism, Baltimore 1955, E. WORK, S. 462.

[26] A.J.VIRTANEN und S.KARI, Acta chem.Scand. 8, 1290 (1954); 9, 170 (1955).

[27] B.WITKOP und C.M.FOLTZ, J.Amer.chem.Soc. 79, 192 (1957). N.GROBBELAR, J.K.POLLARD und F.C.STEWARD, Nature 175, 703 (1955).

2. Glutaminsäure - Glutamin

Papierchromatogramme von den freien Aminosäuren der Ricinuskeimpflanzen zeigen neben Glutaminsäure und Asparaginsäure eine grössere Menge Glutamin an. Letzteres beginnt unter den angegebenen Bedingungen zwischen dem 6. und dem 9. Tag der Keimung vermehrt aufzutreten, wie sich aus Untersuchungen der relativen Aminosäuremengen mit Hilfe der DNP-Methode schliessen lässt.

Nach Injektion von Glutaminsäure-[2-^{14}C] oder Verfüttern von Glutaminsäure-[1-^{14}C] entsteht radioaktives Ricinin, dessen Abbau die in Tab. IV wiedergegebene Aktivitätsverteilung zeigt. Zur besseren Übersicht ist die Einbaurate entsprechend Abb. 5 in den folgenden Tabellen nochmals angegeben.

Tab. IV Aktivitätsverteilung im Ricinin aus Versuchen mit ^{14}C-markierter Glutaminsäure

Einbaurate (%)	Ric. aus Versuch mit	Aktivität der Ric.-C-Atome in Prozent der Gesamtaktivität des Ricininpräparats							
		C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
(0.23)+	Glu-[1-^{14}C]	11		5	6	31	3	21	3
0.84	Glu-[2-^{14}C]	15	0	6	9	2	0	55	1

+ mit der Nährlösung verabreicht.

3. Asparaginsäure

Nach Applikation von Asparaginsäure-[3-^{14}C] entsteht radioaktives Ricinin. Man erzielt eine bemerkenswert hohe ^{14}C-Einbaurate. Die Aktivitätsverteilung im Alkaloidmolekül zeigt Tab. V.

Tab. V Aktivitätsverteilung im Ricinin aus dem Versuch mit Asparaginsäure-[3-^{14}C]

Einbaurate (%)	Aktivität der Ric.-C-Atome in Prozent der Gesamtaktivität des Ricininpräparats							
	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
0.98	0	42	6	1	10	3	16	5

4. Acetat

Acetat-[1-^{14}C] und Acetat-[2-^{14}C] wurden von U. SCHIEDT injiziert und das resultierende Ricinin abgebaut. Die Auswertung der Isotopenmessergebnisse gibt Tab. VI an.

Tab. VI Aktivitätsverteilung im Ricinin aus Versuchen mit ^{14}C-markiertem Acetat

Einbaurate (%)	Ric. aus Versuch mit	Aktivität der Ric.-C-Atome in Prozent der Gesamtaktivität des Ricininpräparats							
		C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
0.55	Ac.-[1-^{14}C]	$\leq$ 6		4	5	27	3	33	3
1.72	Ac.-[2-^{14}C]	$>$48		8	9	2	8	12	6

5. C_1-Verbindungen

a) Formiat: Durch Injektion von Formiat-[^{14}C] kann bei weitem die höchste ^{14}C-Einbaurate erzielt werden. Es ist ungeklärt, warum sich Formiat-[^{14}C], mit der Nährlösung an Ricinuspflanzen verabreicht, in Experimenten von DUBECK und KIRKWOOD[17] als unwirksam erwiesen hatte.

Die Ricininabbauergebnisse sind aus Tab. VII ersichtlich.

Tab. VII Aktivitätsverteilung im Ricinin aus Versuchen mit ^{14}C-markierten C_1-Verbindungen

Einbaurate (%)	Ric. aus Versuch mit	Aktivität der Ric.-C-Atome in Prozent der Gesamtaktivität des Ricininpräparats							
		C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
2.18	H^{14}COONa	1		1	1	2	47	1	55
0.17	Na^{14}CN	(ca. 4)		4	5	12	7	51	9
0.28	NaH^{14}CO$_3$	21	0	8	6	32	2	11	3

b) Cyanid: Es gibt neben dem Ricinin in der Natur nur ganz wenige Verbindungen, die eine Nitrilgruppe besitzen, jedoch nicht die Konstitution eines Cyanhydrins aufweisen. Weiterhin ist bisher unbekannt, in welcher Form Blausäure, die zur Biosynthese cyanogenetischer Heteroside benötigt wird, in den pflanzlichen Zellen vorliegt.

Applikation von 0.12 mg $Na^{14}CN$ pro Keimling verursacht bei Injektion keinerlei Schädigung. Man erhält signifikant markiertes Ricinin, dessen Abbauergebnisse Tab. VII zeigt.

c) Bicarbonat: Entgegen den bei Fütterungsversuchen erhaltenen Befunden von DUBECK und KIRKWOOD[17] kann durch Injektion von Natriumbicarbonat-[^{14}C] radioaktives Ricinin gewonnen werden. Die Aktivitätsverteilung gibt Tab. VII an.

E. Diskussion der Ergebnisse in Bezug auf die Biosynthese des Ricinins

Wie aus der schematischen Übersicht Abb. 7 +) hervorgeht, wurde die Radioaktivität aller applizierten Verbindungen mehr oder weniger auf das Ricininmolekül verteilt. Keines der untersuchten Ricinin-[^{14}C]-Präparate erwies sich als so eindeutig markiert, dass man die verabreichte Verbindung als direkte Vorstufe des Pyridonrings ansprechen könnte. Jedoch zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Ricininmolekül im einzelnen bemerkenswerte Unterschiede.

In Tier, Pflanze und Mikroorganismus gehen die Heteroringe zahlreicher Verbindungen durch intramolekulare Kondensation aus einfachen Aliphaten hervor. Dabei sind deren Gliederzahl und vor allem ihre funktionellen Gruppen von Bedeutung. Da mehrfach Alkaloidbildung auf Kosten von Aminosäuren beobachtet worden ist[28], liegt es nahe, zu vermuten, dass eine geeignete Aminosäure durch Cyclisierung den Pyridonring des Ricinins herstellt. Entsprechende Reaktionen sind für die Biogenese hydrierter N-Heterocyclen in Alkaloiden nachgewiesen worden[29].

Lysin, das in diesem Sinne als Vorstufe des Ricinins in Betracht kommt, bewirkt nach Angaben von BOGDASHEVSKAYA[30] eine definierte Zunahme des Riciningehalts der Pflanze, wenn man die Blätter mit 1proz. Lösung infiltriert. Vor kurzem fand GINSBURG[13] nach Verfüttern von Lysin-[2-^{14}C] Ricinin-[6-^{14}C], sowie nach Applikation von Amino-adipinsäure-[6-^{14}C] Ricinin-[2.6-^{14}C] und schloss daraus, dass Lysin eine unmittelbare Vorstufe des Ricinins ist.

+) am Ende der Arbeit.

28 K. MOTHES, Ann. Rev. of Plant Physiol., Vol. 6, 393 (1955).
W. JAMES, The Alkaloids I, 1950, S. 15.
B. T. CHROMWELL, Biochem. J. 37, 717 (1943).

29 Handb. der Pflanzenphysiol., Bd. VIII, S. 1030, Springer-Verlag, 1958.

30 O. V. BOGDASHEVSKAYA, Doklady Acad. Nauk. SSSR. 99, 853 (1954).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Injektion von Lysin-[^{14}C] radioaktives Ricinin isoliert. Dabei war die Einbaurate jedoch weit kleiner als die mit allen anderen untersuchten Vorstufen erzielte. Das Ricininpräparat enthält 30% seiner Gesamtaktivität in der Nitrilgruppe (C-8). Dieser Wert ist überraschend hoch, da uniform markiertes Lysin verwendet wurde. Über die Verteilung der Radioaktivität in dem applizierten Lysin ist nichts bekannt. Setzt man voraus, dass jedes C-Atom des Lysins etwa gleich stark markiert war, so kann die Anhäufung von 30% der Aktivität in C-8 nur so gedeutet werden, dass das Lysin zu kleinen Bruchstücken abgebaut wird, die ihrerseits zum Teil in die Nitrilgruppe eingehen. Diese Auffassung wird noch gestützt durch die, im Vergleich zu anderen Vorstufen, geringe Einbaurate (Abb. 5) des Lysins. Als solche kleinen Bausteine kämen z.B. Acetat-Einheiten in Betracht (vgl. Abb. 7), die auch eine wirksame Vorstufe für Nicotin (VIII) darzustellen scheinen [31]. Eine Entscheidung zwischen dieser Auffassung und der Hypothese von GINSBURG [12,13] ist mangels geeigneten Materials bisher nicht möglich, jedoch sind auch 2 unabhängige Biosynthesewege eventuell denkbar.

Als weitere Aminosäure, die zum N-heterocyclischen 6-Ring cyclisiert werden kann, kommt Glutaminsäure in Frage. Die beiden zweibasigen Aminosäuren, Asparaginsäure und Glutaminsäure, sowie ihre Säureamide sind von grosser Bedeutung für die Proteinbiosynthese. Insbesondere Glutaminsäure und Glutamin nehmen eine zentrale Position innerhalb des gesamten N-Stoffwechsels der Pflanzen und Tiere ein. Es ist bekannt, dass das Verhältnis von Glutamin und Asparagin zueinander in den Pflanzen wechselnd ist [32]. Man kann danach "Glutamin-Pflanzen" von "Asparagin-Pflanzen" unterscheiden. Die voll entwickelte Ricinuspflanze gehört zu den ausgesprochenen "Glutamin-Pflanzen". Es war daher von besonderem Interesse, die Rolle der Glutaminsäure bei der Ricininsynthese zu untersuchen.

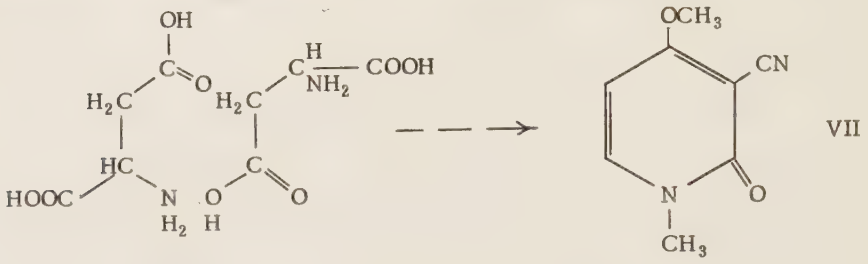
Angebot von Glutaminsäure-[2-^{14}C] bewirkt eindeutige Hauptmarkierung von C-8. Glutaminsäure-[1-^{14}C] liefert Ricinin, das in C-6 und in C-8 markiert ist. Eine sehr ähnliche Markierung wird bemerkenswerterweise durch Applikation von Acetat-[1-^{14}C] erhalten. Der Wirkungsgrad des Acetats ist aber höher, was dafür spricht, dass es der Ricininvorstufe näher steht, als Glutaminsäure. Eine direkte Cyclisierung von letzterer zum Pyridonring des Ricinins ist deshalb unwahrscheinlich.

---

31 E. LEETE, Chem. and Ind., Nr. 45, 1477 (1958).

32 Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VIII, S. 718, Springer-Verlag, 1958.

Mit unerwartet guter Einbaurate wird Asparaginsäure-[3-^{14}C] bei der Biogenese des Alkaloid-Moleküls verwertet. Aus den Abbauergebnissen geht hervor, dass das Ricinin eine gezielte Markierung in C-3 trägt. Beides sind Hinweise für die nahe Beziehung dieser Aminosäure zur unmittelbaren Vorstufe des Ricinins. Das Ricinin wird aber nicht aus zwei gleichen Molekülen hergestellt, wie man sich in Analogie z.B. zur Porphobilinogenbiosynthese hätte vorstellen können:



VII

Die Aktivitätsverteilung im Ricinin (Abb. 7) ist derjenigen, die nach Injektion von Acetat-[2-^{14}C] erhalten wird, auffällig ähnlich. Bei Applikation von Acetat-[2-^{14}C] wird der radioaktive Kohlenstoff auch vorwiegend in C-2 + C-3[+)] eingebaut. Dieser Befund ist nicht überraschend, weil Acetat-[2-^{14}C], wenn es in den Glyoxylsäurecyclus (Abb. 8) eingeht, zu einer 2.3-^{14}C-markierten C_4-Säure führt (Abb. 9). Das Vorherrschen des Glyoxylsäurecyclus gegenüber dem Citronensäurecyclus wurde von KORNBERG [33] für Ricinuskeimlinge nachgewiesen.

Nachdem Acetat-[2-^{14}C] noch weit stärker in das Ricinin eingeht als Asparaginsäure-[3-^{14}C], kann man eine N-freie C_4-Säure als unmittelbare Ricininvorstufe vermuten. Die Nicotinsäurebioxynthese in E. coli[4] aus Bernsteinsäure-[2.3-^{14}C] gibt auch für den Pyridinring Hinweise in dieser Richtung.

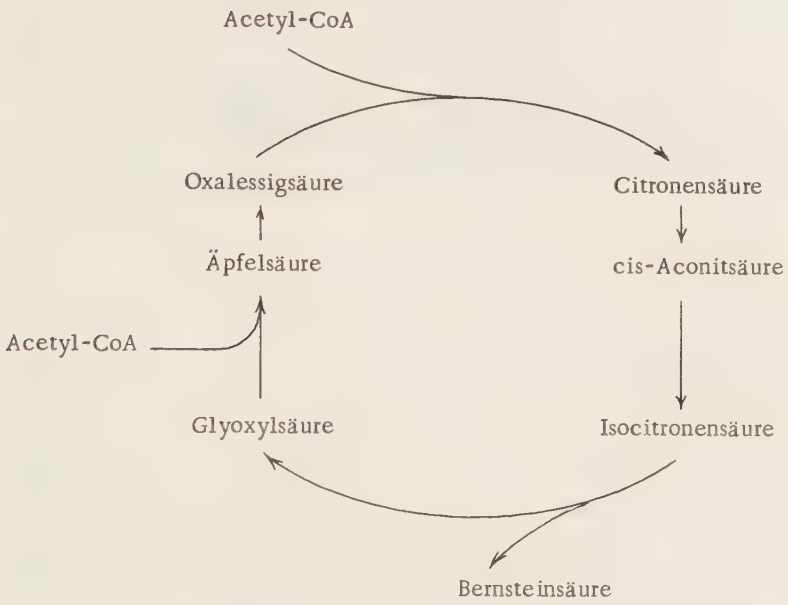
Die Ricinin-Atome 4 und 5 weisen in allen Versuchen eine schwache Markierung fast gleichen Ausmasses auf und können nach den Abbauergebnissen nicht direkt von Acetat-Einheiten stammen.

C-6 und unter Umständen auch C-8 haben offenbar eine "C_1-Körper"-Kohlenstoffquelle vom Typ der Kohlensäure: Einbau der Carboxyl-C-Atome von Acetat und Glutaminsäure, sowie der Einbau von Bicarbonat.

[+)] Beim Abbau durch U. SCHIEDT spezif. Akt. des Kohlendioxyds aus Reaktion 4 a/b nicht bestimmt.

[33] H.L. KORNBERG und H. BEEVERS, Nature 180, 35 (1957).

Abb. 8 Glyoxylsäurecyclus nach KORNBERG und KREBS [34]

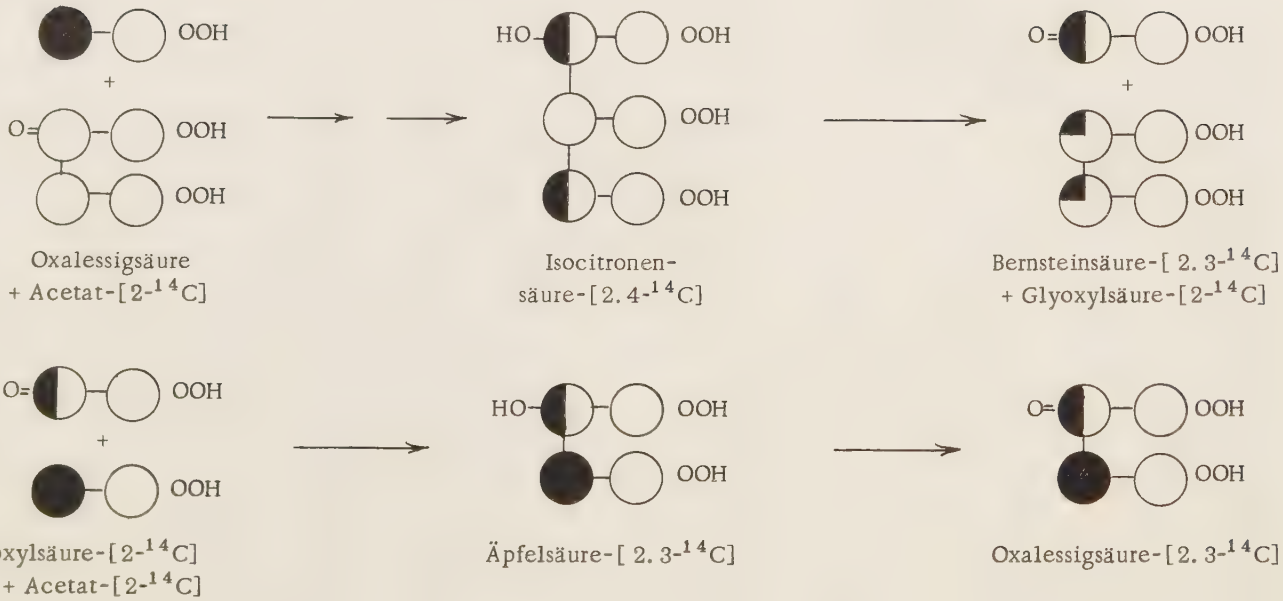


In pflanzlichen Organismen nimmt Methionin die Schlüsselstellung bezüglich Synthese und Übertragung "labiler Methylgruppen" ein. Da seine S-Methylgruppe bei Neubildung aus Formiat hervorgehen kann, durfte man erwarten, dass dieses über Methionin als Vorstufe der Methylgruppe des Ricinins wirksam werden würde. Entsprechend erhält man mit Formiat-[^{14}C], genau wie beim Verfüttern von Methionin-[methyl-^{14}C][17] Ricinin, in dem das Kohlenstoffisotop mit hoher Einbaurate zu fast gleichen Teilen in den beiden Methylgruppen (C-7, C-9) fixiert ist. Dagegen erfahren weder die Nitrilgruppe noch eines der Ringatome signifikante Markierung. Im Zusammenhang mit dem Bicarbonat-[^{14}C]-Versuch erläutert dieser Befund, dass in Ricinuskeimlingen keine Oxydation "labiler" Methylgruppen zu Kohlensäure stattfindet.

Über Formiat wird auch Cyanid-[^{14}C] in geringem Ausmass als ^{14}C-Donator für Ricinin wirksam, wie man aus der relativ hohen Aktivität der beiden Methylgruppen erkennt. Gleichzeitig markiert es das Carboxyl-bezogene C-Atom 6.

[34] H. L. KORNBERG und H. A. KREBS, Nature 179, 988 (1957).

Abb. 9 Acetat-[2-^{14}C] im Glyoxylsäurecyclus

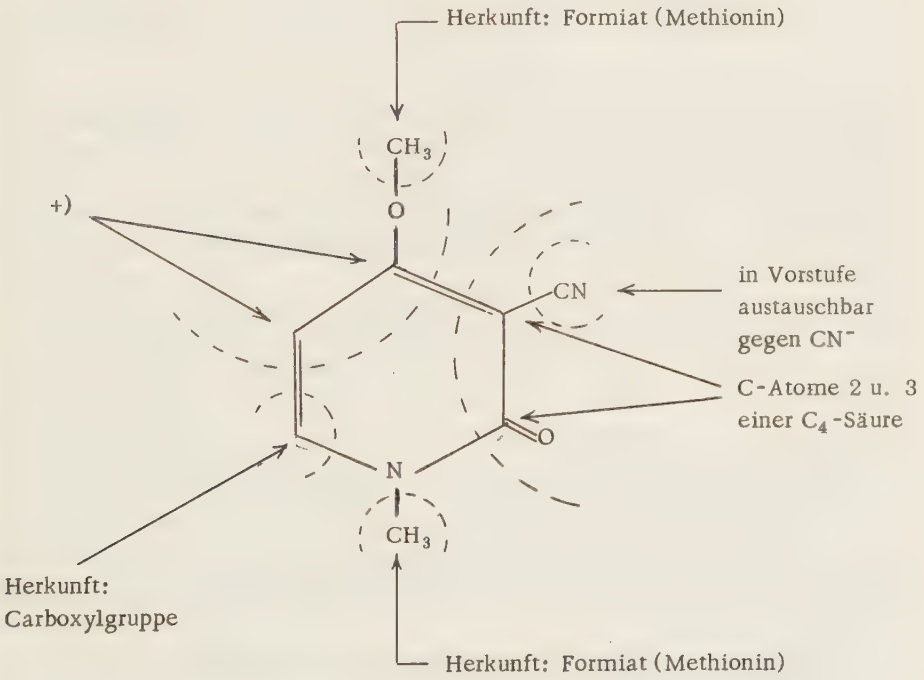


(jeder Kreis bedeutet ein C-Atom; die ^{14}C-Markierung - schwarz gezeichnet - verteilt sich in symmetrischen Verbindungen unter Verdünnung)

Am wichtigsten ist aber die relativ hohe Aktivität, die mit Cyanid-[^{14}C] in C-8 gelangt. Dieses C-Atom nimmt anscheinend im Ricinin eine Sonderstellung ein, denn die erwähnte Markierung zeigt, dass Blausäure direkt in der Nitrilgruppensynthese Verwendung finden kann. Eventuell ist C-8 in einer Ricininvorstufe gegen CN^- austauschbar, wie man es von Cyanhydrinen her kennt.

Die vorliegenden Einbaustudien lassen erkennen, dass sich das Ricinin wahrscheinlich aus mehreren kleinen Verbindungen im Sinne der schematischen Darstellung Abb. 10 zusammensetzt, wobei die Natur der Bausteine zum Teil noch ungeklärt bleibt.

Abb. 10 Schema zur Biogenese des Ricinins



+) mittelständige Atome einer Kettenverbindung; nicht Carboxyl-bezogen und nicht direkt von Acetat.

III. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

A. Versuche an Keimpflanzen

1. Hydrokultur der Versuchsobjekte

In allen Versuchen wurden Dunkelkeimlinge von Ricinus communis L. var. sanguineus bzw. var. "Red Spire" verwendet.

Probeweise wurden auch Keimlinge der var. zansibariensis gezogen. Die Keimpflanzen waren zwar kräftiger, als die oben genannten, aber die Samen keimten ungleichmässig und nur zu 30%.

Die Samen werden in sägemehlgefüllten Blumentöpfen zur Keimung gebracht. Die für schnelle und gleichmässige Keimung optimale Temperatur beträgt 28-30°.

Masse der Töpfe: 15 cm oberer Durchmesser, 18 cm Höhe.
Trägermaterial: Sägespäne, die trocken mit 1 g fein gepulvertem Tetrachlorbenzochinon pro Topf vermischt werden. Man füllt die Töpfe zu $^3/_4$ mit Sägespänen und schüttet sie mit Sägemehl bis zum Rand voll.
Bewässerung: Das Trägermaterial sättigte man vor dem Bepflanzen vollkommen mit Wasser und stellte die besetzten Töpfe in den ersten 5 Tagen 6 cm, später 3 cm tief in Leitungswasser.
Bepflanzung: 12-15 Samen werden, um eine ungekrümmte primäre Wurzel zu erzielen, mit der Caruncula senkrecht nach unten etwa 1 cm tief in feuchtes Sägemehl eingesetzt. Vorher wälzte man sie in Tetrachlorbenzochinon, um Schimmelbildung zu vermeiden. Es erwies sich als ungünstig, die Samen durch Einlegen in Wasser vorquellen zu lassen.

Zu den Injektionsversuchen überführt man die Keimpflanzen etwa am 3. Tag der Keimung in Kulturröhren (Abb. 2).

Masse der Kulturröhren: 2.6 cm innerer Durchmesser, 12 cm Länge.
Drahtschlingen: hergestellt aus V 2a-Stahldraht; Durchmesser des Rings 2.6 cm, Stiellänge etwa 22 cm.
Inhalt der Kulturröhren: 25-30 ml Nährlösung, direkt vor Gebrauch gemischt und dampfsterilisiert.
Zusammensetzung der Nährlösung nach HOAGLAND: Die Summe der angegebenen Mengen der Salzlösungen wird mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

5 ml	1-m-$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	2 ml	1-m-$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
5 ml	1-m-KNO_3	1 ml	0.5proz. $FeSO_4$
1 ml	1-m-KH_2PO_4	1 ml	Spurenmetallösung

Spurenmetallösung: In 1 Liter Wasser werden gelöst:

2,86 g	H_3BO_3	0,08 g	$CuSO_4 \cdot H_2O$
1,81 g	$MnCl_2 \cdot H_2O$	0,04 g	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$
0,22 g	$ZnSO_4 \cdot H_2O$	0,09 g	85proz. Molybdänsäure

Die Nährlösung wird mit Wasser im Verhältnis 1 : 2 verdünnt.

2. Ricininbestimmungen

a) in der Nährlösung: 60 Pflanzen wurden am 6. Tag der Keimung in Nährlösungkultur umgesetzt. Darin beliess man sie 10 Tage.

Die vereinigten Nährlösungen wurden i. Vak. bei 50° zur Trockene gebracht. Der in Chloroform aufgenommene Rückstand passierte eine Säule (30·5 cm) von Al_2O_3 neutral, Akt. 1. Den Trockenrückstand des etwa 100 ml betragenden Chloroformeluats füllte man zu 75 ml mit Wasser auf. Die bei 306 mμ ermittelte Extinktion der Lösung war log I_O/I = 1.032. Daraus berechnet sich die Ricininkonzentration[35] nach dem LAMBERT-BEERschen-Gesetz zu c = 20.77 · 1.032 = = 21.40 γ/ml.

60 Pflanzen hatten somit in 10 Tagen in die Nährlösung durch die Wurzel insgesamt 1.605 mg Ricinin ausgeschieden.

b) in Homogenaten:

Versuch 1: Die Keimblätter von vier 7 Tage alten Pflanzen wurden im Porzellanmörser mit etwas Quarzsand in 0.2-m-Phosphatpuffer (p_H 7) völlig zerrieben. Der so erhaltene Brei wurde etwa 2 Min. bei 15-20 000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand mit Phosphatpuffer auf 10 ml aufgefüllt. 2 ml davon wurden sofort (5 Min.) mit HCl angesäuert, 2 · 2 ml 6 Stdn. bei 30° stehengelassen und erst dann mit HCl versetzt.

Man brachte die Ansätze schonend zur Trockene, benetzte die Rückstände mit gesättigter Sodalösung, trug nach 15 Min. $MgSO_4$ ein und trocknete das so erhaltene Pulver über P_2O_5. Danach schlämmte man es in warmem Chloroform

---

[35] Das UV-Spektrum des Ricinins weist 2 Maxima (255 mμ; 306 mμ) auf. Die molaren Extinktionen (ε) betragen[x]

$$\varepsilon_{255} = 3.82 \cdot 10^3 \text{ und } \varepsilon_{306} = 7.89 \cdot 10^3$$

auf, filtrierte über Al_2O_3 (neutral, Akt. 1), brachte die Chloroformeluate in Messkölbchen zur Trockene und löste die Rückstände in je 10 ml Wasser. Diese Lösungen wurden bei 306 mμ photometriert. Die Ergebnisse zeigt Tab. VIII.

Tab. VIII Riciningehalt von Gewebebrei der Keimblätter 7 Tage alter Pflanzen

Inkubationszeit	log I_o/I	γ/ml	mg/4 Keimbl. paare	mg/Keimbl. paar
5 Min.	1.153	23.94	1.197	0.274
6 Stdn.	1.772	36.80	1.840	0.443
	1.642	34.10	1.705	

Versuch 2: Die Keimblätter von sechs 8 Tage alten Keimlingen wurden, wie oben beschrieben, zerrieben. Man erhielt 11 ml Homogenat-Überstand. Davon wurde für jede Bestimmung 1 ml verwendet.

Das, wie in Versuch 1 isolierte Ricinin, photometrierte man, in je 50 ml Wasser gelöst.

Eine Bestimmung wurde nach 5 Min., eine Doppelbestimmung nach 27 Stunden vorgenommen. Die Homogenate wurden mit einigen Tropfen Toluol überschichtet. Die Ergebnisse zeigt Tab. IX.

Tab. IX Ricininzunahme im Homogenat von Keimblättern 8 Tage alter Pflanzen

Inkubationszeit	log I_o/I	γ/ml	mg/6 Keimbl. paare	mg/1 Keimbl. paar	
5 Min.	0.272	5.65	3.1075	0.518	
27 Stdn.	1.092	22.68	12.4740	2.0790	1.872
	0.875	18.17	9.9935	1.6655	

c) in Keimlingen nach Pipecolinsäureinjektion: 6 Tage alten Pflanzen wurden pro Pflanze etwa 0.8 mg DL-Pipecolinsäure-hydrochlorid injiziert. Nach 3 und nach 10 Tagen bestimmte man den Riciningehalt der Keimblätter von injizierten und nicht injizierten Pflanzen. Die Ergebnisse zeigt Tab. X.

Tab. X Riciningehalt von Keimblättern pipecolinsäureinjizierter Pflanzen

Tage nach Injektion	Pip. injiziert	Trocken-substanz[mg]	Ricinin mg	Ricinin % d. Trockengew.
3	-	206	4.7	2.3
	+	223	3.9	1.8
10	-	322	11.1	3.6
	+	294	9.8	3.3

DL-Pipecolinsäure wurde durch Oxydation von α-Picolin mit Kaliumpermanganat und anschliessende Hydrierung der Pyridin-carbonsäure-(2) in Eisessig über Platin bei 55 at/35-40° dargestellt.

3. Untersuchung der freien Aminosäuren

a) papierchromatographisch:

Versuch 1: Dunkelkeimlinge wurden nach Trocknen in 70 proz. Äthanol oder in frischem Zustand mit 96 proz. Äthanol extrahiert. Den Rückstand des Äthanolauszuges nahm man in Wasser auf, schüttelte ihn mehrmals mit Äther aus, engte die wässrige Phase auf ein kleines Volumen ein und stellte Papierchromatogramme der darin enthaltenen freien Aminosäuren her. Man benutzte die Systeme:

1. n-Butanol/Pyridin/Wasser (1:1:1)
2. Phenol/96 proz. Äthanol/Wasser (3:1:1)
3. n-Butanol/Eisessig/Wasser (5:1:4)
4. sek.-Butanol/Ameisensäure/Wasser (75:13:12).

Man trennte die Phasen der Systeme nicht. Es wurde mit der aufsteigenden Methode an Schleicher u. Schüll-Papier 2043b chromatographiert. Für 1-dimensionale Chromatogramme verwendete man die Mischungen 1. oder 2., für 2-dimensionale 1. + 2., 1. + 3. und 1. + 4..

Die Papierchromatogramme wurden mit einer 0.05 proz. Lösung von Ninhydrin in wassergesättigtem Butanol besprüht und 15 Min. bei 80-100° entwickelt. Pipecolinsäure ist im Zweifelsfalle leicht im UV-Licht an ihrer roten Fluoreszenz zu erkennen.

Mit der beschriebenen Methode konnte man in Papierchromatogrammen der freien Aminosäuren von Phasaeolus vulgaris-Keimlingen Pipecolinsäure nachweisen, wie man es nach BOULANGER erwarten musste [36].

[36] P. BOULANGER, I. CLAVEAU und G. BISERTE, C.R. 241, 577 (1955).

In den Chromatogrammen der Aminosäuren von Ricinuskeimlingen deutete nichts auf die Anwesenheit von Pipecolinsäure, auch Lysin wurde nicht gefunden.

Versuch 2: In das Nährgewebe 6 Tage alter Keimlinge wurden pro Pflanze 0.8-1.0 mg DL-Pipecolinsäure-hydrochlorid injiziert. Das nach 3 Tagen aus diesen Pflanzen hergestellte Aminosäurenchromatogramm zeigte keine Pipecolinsäure mehr.

Versuch 3: Ebenso wurde 1 mg L(+)-Lysin pro Pflanze injiziert und bei der Aufarbeitung nach 5 Tagen weder Lysin noch Pipecolinsäure nachgewiesen.

b) mit Hilfe der DNP-Methode:
Versuch 1: Ein Äthanolauszug von 2 Keimlingen, die 9 Tage alt waren, wurde zur Trockene gebracht, der Rückstand in 25 ml Wasser aufgenommen und 1 ml dieser Lösung mit Fluor-dinitro-benzol (FDNP) im Autotitrator bei $p_H 9/40^o$ unter Verwendung von 0.2-n-NaOH-Lösung in 120 Min. umgesetzt. Aus dem wässrigen Reaktionsgemisch wurden die DNP-Aminosäuren nach BRAUNITZER [37] mit Essigester ausgeschüttelt und 2-dimensional in (1) n-Butanol/NH_3 und (2) 2-m-Phosphatpuffer, $p_H 8.4$, nach der absteigenden Methode an Schleicher u. Schüll-Papier 2043b chromatographiert.

Die Flecken der einzelnen DNP-Aminosäuren wurden ausgeschnitten und mit je 5 ml 1 proz. Bicarbonatlösung eluiert. Die Extinktionen der Lösungen wurden bei 360 mμ (bzw. DNP-Prol 385 mμ) gemessen.

Von LEVY [38] werden die mikromolaren Extinktionskoeffizienten der DNP-Aminosäuren in 1 proz. Bicarbonatlösung angegeben. Da $M/\varepsilon \cdot d$ bei den meisten annähernd 0.061 beträgt, darf man diesen Faktor in erster Näherung zur Errechnung der absoluten Aminosäuremengen aus den gemessenen Extinktionen verwenden.

Für eine Anzahl der so bestimmten Aminosäuren gibt Tab. XI die ermittelten Werte an.

Die Konzentration der 1 proz. Bicarbonatlösung einer DNP-Aminosäure ist:

$$c\left[\frac{\text{Mol}}{\text{ml}}\right] = 0.061 \cdot \log I_o/I_{max}$$

---

[37] G. BRAUNITZER, Ber. dtsch. chem. Ges. 88, 2030 (1955).
[38] A. L. LEVY, Nature 174, 126 (1954).

Tab. XI Aminosäuremengen in 2 Keimlingen von 9 Tagen

DNP-Aminosäure	log I_o/I	Mol/ml	Mol/Pflanze
Ala	0.910	0.056	3.50
Asp	0.047	0.003	0.18
Gly	0.283	0.017	1.06
Glu	0.248	0.015	0.94
Glu·NH_2	0.805	0.049	3.06
Ser	0.329	0.020	1.25
Thre	0.598	0.036	2.25

Versuch 2: Aus mehreren 6 Tage alten Keimlingen wurde ein Aminosäureextrakt, wie oben beschrieben, gewonnen und ein Teil davon mit FDNP umgesetzt. Tab. XII lässt aus den Konzentrationen der Lösungen die relativen Mengen der Aminosäuren erkennen. Man sieht, dass die Glutaminmenge (µMol/ml) zu diesem Zeitpunkt genauso gross ist wie z.B. die von Glutaminsäure oder Glycin, während sie deren Menge im 9-Tage-Stadium weit übertrifft (Versuch 1).

Tab. XII Relative Aminosäuremengen in 6 Tage alten Keimlingen

DNP-Aminosäure	log I_o/I	Mol/ml
Ala	0.389	0.024
Asp	0.107	0.006
Gly	0.180	0.011
Glu	0.168	0.010
Glu·NH_2	0.204	0.012
Ser	0.130	0.008
Thre	0.142	0.009

c) Untersuchung der freien Iminosäuren: Ein wässriger Aminosäurenextrakt, der wie unter 3. a) beschrieben erhalten worden war, passierte einen Ionenaustauscher von H^+-Form (DOWEX 50 x 4, 200-400 mesh). Man eluierte die Aminosäuren mit 1.5-n-NH_3-Lösung, versetzte das Eluat mit 0.5-m-Natriumnitritlösung und 0.25-n-HCl. Dabei bilden die Iminosäuren beständige Nitrosoverbindungen, während die α-Aminosäuren desaminiert werden. Man ätherte die Nitrosamine aus, erhitzte den Trockenrückstand des Ätherextrakts 2 Stdn. mit 6-n-HCl zum Sieden und papierchromatographierte das Hydrolysat. Als einzige ninhydrinpositive Substanz wurde Prolin gefunden.

B. Auswertung der Isotopenmessergebnisse

Man verwendete als Geigerzähler den SC-16 Windowless Flow-Counter von der Firma Tracerlab in Verbindung mit dem Zähler FH 49 von der Firma Friesecke u. Hoepfner (1α) oder dem Autoscaler SC-51 von Tracerlab (2α).

Die absoluten Aktivitäten der radioaktiven Ricininvorstufen wurden in relative Aktivität umgerechnet, indem man die Annahme zugrunde legte, dass 40% der Zerfälle registriert werden.

1. Ermittlung der Einbauraten

Zur Bestimmung der relativen spezif. Akt. des nach Applikation radioaktiver Vorstufen gewonnenen Ricinins trocknete man eine Lösung von 0.2-0.7 mg Ricinin in Chloroform auf einem Aluminiumschälchen oder einem Ni-platierten Stahlschälchen (4.5 cm^2) so ein, dass die Substanz annähernd gleichmässig verteilt war, man also eine annähernd "unendlich dünne Schicht" zur Messung brachte. Nach der Impulszählung spülte man das Ricinin mit Wasser in einen kleinen Messkolben und ermittelte den Ricininggehalt der Lösung spektrophotometrisch.

Die Einbauraten wurden nach folgendem Beispiel berechnet:

injiz. Asparaginsäure-[3-^{14}C]			isoliert. Ricinin			%
mg	Imp. / Min. · mg	total Akt. Imp./Min.	mg	Imp. / Min. · mg	total Akt. Imp./Min.	Einbaurate +)
128	$2.57 \cdot 10^5$	$328 \cdot 10^5$	200	1600	$3.2 \cdot 10^5$	0.98

+) isolierte tot. Akt. als % der injiz. tot. Akt.

Die Einbauraten der untersuchten Verbindungen zeigt Tab. XIII und Abb. 5.

Tab. XIII Einbauraten

Injizierte Substanz		Isoliertes Ricinin		Einbaurate in %
Verbindung	total Akt. Imp./Min.	spezif. Akt. Imp. / Min. · mg	total Akt. Imp./Min.	
Lysin-[^{14}C]	$250 \cdot 10^5$	95	$0.28 \cdot 10^5$	0.11
Glu-[1-^{14}C] +)	$870 \cdot 10^5$	348-416	$1.80 \cdot 10^5$	0.23
Glu-[2-^{14}C]	$880 \cdot 10^5$	1770	$7.40 \cdot 10^5$	0.84
Asp-[3-^{14}C]	$328 \cdot 10^5$	1600	$3.20 \cdot 10^5$	0.98
Ac.-[1-^{14}C]	$1190 \cdot 10^5$	2690	$6.54 \cdot 10^5$	0.55
Ac.-[2-^{14}C]	$2070 \cdot 10^5$	9750	$35.60 \cdot 10^5$	1.72
Formiat-[^{14}C]	$1630 \cdot 10^5$	21350	$35.60 \cdot 10^5$	2.18
Cyanid-[^{14}C]	$1490 \cdot 10^5$	850	$2.60 \cdot 10^5$	0.17
$NaHCO_3$-[^{14}C]	$1460 \cdot 10^5$	2205	$4.08 \cdot 10^5$	0.28

+) wurde mit der Nährlösung verabreicht.

2. Bestimmung der relativen molspezif. Aktivitäten der beim Abbau von Ricinin-[^{14}C]-Präparaten erhaltenen Verbindungen.

a) Methode: Die Endprodukte des Abbaus sind Kohlendioxyd bzw. Bariumcarbonat und Trimethylamin bzw. Tetramethylammoniumreineckat. Die Aktivität des Ricinins, sowie der Zwischenverbindungen des Abbaus wurden nach Nassverbrennung zu Kohlendioxyd ermittelt. Als Mass für die Radioaktivität dieser Präparate registrierte man Impulszählungen. Diese mussten bezüglich Selbstabsorption korrigiert werden, wenn man sie untereinander vergleichen wollte, denn es war nicht möglich, immer eine gleich dicke Schicht herzustellen.

Man entschied sich, zur Kompensation der Selbstabsorption ein rechnerisches Verfahren auszunutzen. SCHWEITZER und STEIN [39] leiten für die Absorption energiearmer β-Strahlen eine Formel ab, mit deren Hilfe man die Messergebnisse beliebig dicker Präparate auf "Aktivität bei unendlich dünner Schicht" umrechnen kann. Man erhält also lineare Abhängigkeit der Aktivität von der Schichtdicke einer ^{14}C-haltigen Substanz. Die Formel lautet:

$$\text{(Ia)} \quad \frac{A}{\overset{\infty}{A}} = \frac{1-e^{-\alpha S}}{\alpha S} \qquad \text{(Ib)} \quad \overset{\infty}{A} = A \frac{\alpha S}{1-e^{-\alpha S}}$$

Dabei bedeutet A die gemessene Aktivität [Imp./Min.] bei der Schichtdicke S [mg/cm^2]. $\overset{\infty}{A}$ [Imp./Min.] ist die gesuchte Aktivität bei "unendlich dünner

Schicht" und α der von der Messanordnung abhängige Absorptionskoeffizient. α beträgt für fensterlose Zählrohre nach Literaturangaben 0.288 ± 0.008[40] bzw. 0.322[41] und kann als Mittelwert aus der Messreihe eines Bariumcarbonat-[^{14}C]-Präparats verschiedener Schichtdicke ermittelt werden nach der Formel: [39]

(IIa) $$\frac{A}{N_\infty} = 1 - e^{-\alpha S}$$

(IIb) $$\alpha = \frac{\ln\left(\frac{1}{1 - A/N_\infty}\right)}{S}$$

$$= \frac{\log\left(\frac{N_\infty}{N_\infty - A}\right) \cdot 2.3026}{S}$$

dabei bedeutet A die gemessene Aktivität [Imp./Min.] bei der Schichtdicke S [mg/qcm] und N_∞ die Aktivität [Imp./Min.] bei "unendlich dicker Schicht".

"Unendlich dicke Schicht" liegt, wie sich aus LIBBY s Gleichung[42] ergibt, bei einer Schicht > 25 mg/cm^2 vor.

Die Niederschläge wurden in allen Versuchen auf Filterpapier "geplatet" zur Messung gebracht[15].

b) Ermittlung des Absorptionskoeffizienten α: Durch technische Umstände bedingt, mussten für die folgenden Abbauversuche 2 Zählanordnungen benutzt und daher α 2 mal bestimmt werden.

1. Bestimmung von α, gültig für die Messungen der Präparate aus dem Abbau von Ricinin aus Acetat-[^{14}C], Glutaminsäure-[1-^{14}C], und Formiat-[^{14}C]: N = 900 Imp./Min., Reihenmessung in Tab. XIV angegeben, daraus Mittelwert $\alpha = 0.3217$.

Abb. 11 zeigt, dass die mit $\alpha = 0.322$ aus den Impulszählungen der Reihenmessung für A_∞ rechnerisch ermittelten Werte in befriedigender Annäherung die geforderte lineare Abhängigkeit der Aktivität von der Schichtdicke sowohl für Bariumcarbonat wie für Reineckat aufweisen.

---

[39] G.K. SCHWEITZER und B.R. STEIN, Nucleonics 7/3, 65 (1950).

[40] Calvin, Isotopic Carbon, New York 1946, S. 29.

[41] C.V. ROBINSON und Mitarb., Annal. Chem. 27, 852 (1955).

[42] W.T. LIBBY, Annal. Chem. 19, 2 (1947):
Reichweite R[mg/cm^2] von ^{14}C-β-Partikeln, energiearm ($E_{max} = 0.155$ Mev), ist:

(III) $$R = \frac{E}{150} \text{ [mg/cm}^2\text{]}$$ (E in kev angegeben).

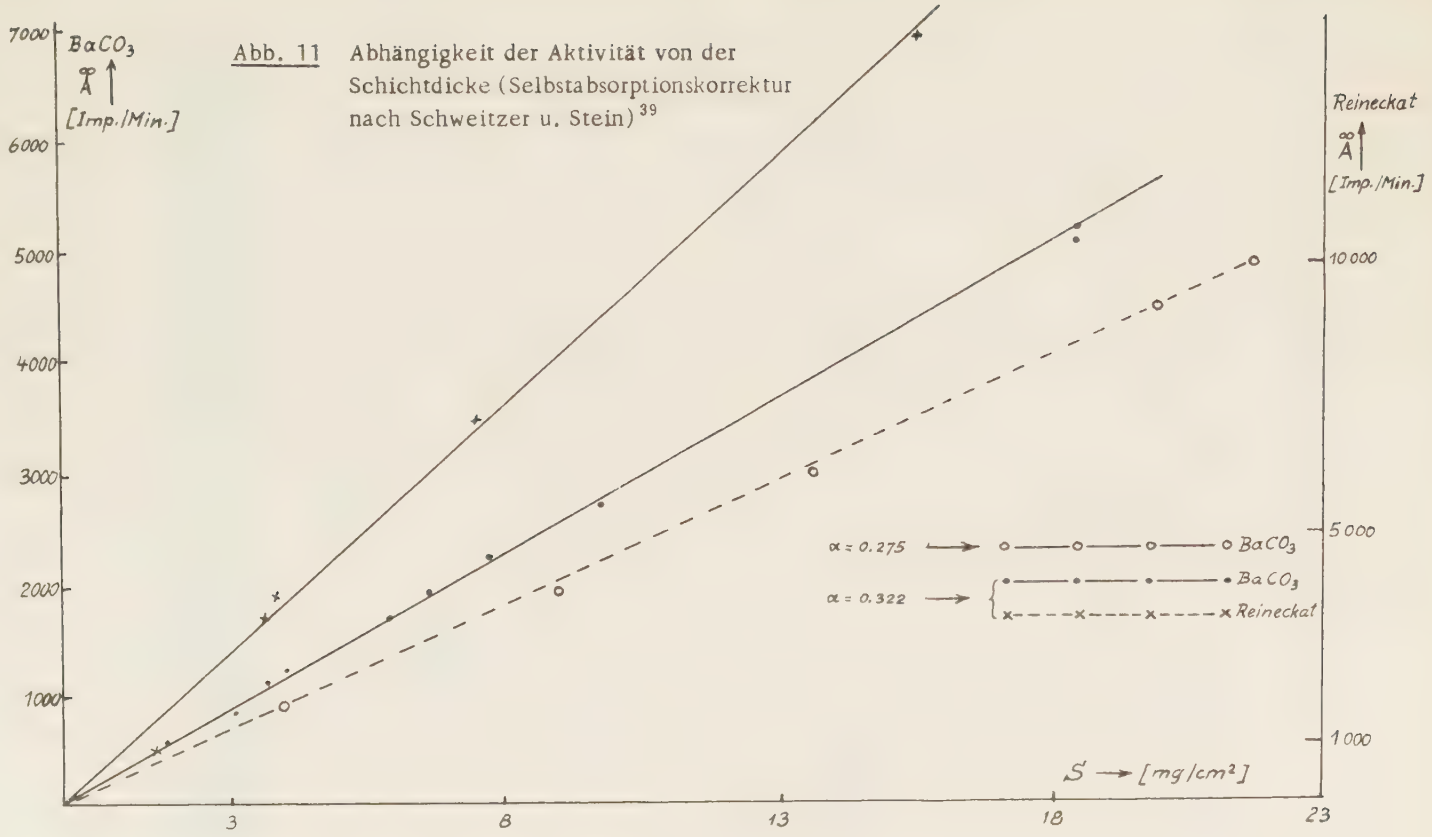


Abb. 11 Abhängigkeit der Aktivität von der Schichtdicke (Selbstabsorptionskorrektur nach Schweitzer u. Stein)[39]

Tabelle XIV Messreihe von Bariumcarbonat-[^{14}C]

1. Bestimmung von α:

A [Imp./Min.]	S [mg/cm^2]	α (N = 900)	$\mathfrak{A}$ (α = 0.322)
448.9	1.87	0.3687	597.9
647.9	3.72	0.3420	1112.7
685.8	4.07	0.3527	1225.8
761.5	5.80	0.3226	1682.2
770.8	6.60	0.2941	1860.2
852.5	7.63	0.3856	2291.0
843.9	9.62	0.2885	2737.9
880.8	18.38	0.2090	5229.8
898.0	18.40	0.3320	5339.5

Tab. XV gibt die Ergebnisse für eine Messreihe von Tetramethylammoniumreineckat an.

Tab. XV Messreihe von Reineckat-[^{14}C]

A [Imp./Min.]	S [mg/cm^2]	$\mathfrak{A}$ berechnet für α = 0.322
771	1.64	992
2026	3.6	3422
2130	3.8	3779
2710	7.4	7115
2745	15.4	14168
2871	19.3	17891

2. Bestimmung von α, gültig für die Messungen der Präparate aus dem Abbau von Ricinin aus Glutaminsäure-[2-^{14}C], Asparaginsäure-[3-^{14}C], Lysin-[^{14}C], Bicarbonat-[^{14}C] und Cyanid-[^{14}C]: N_∞ (für S = 26.61) = 835 Imp./Min., Reihenmessung in Tab. XVI angegeben; daraus Mittelwert α = 0.2752.

Tab. XVI Messreihe von Bariumcarbonat-[^{14}C]

2. Bestimmung von α:

A [Imp./Min.]	S [mg/cm^2]	α (N_∞ = 835)	$\overset{\infty}{A}$ berechnet für α = 0.2752
582	3.97	0.3009	956.5
746	8.93	0.2506	2005.7
810	13.59	0.2580	3104.9
829	15.97	0.3090	3689.3
830	19.96	0.2552	4576.7
833	21.77	0.2773	5002.1

c) Umrechnung der Impulszählungen auf Aktivität bei "unendlich dünner Schicht" und praktische Ermittlung der molspezifischen Aktivität der Bariumcarbonat- und Reineckat-Präparate:

Man zerlegte die Formel (I b) zur logarithmischen Ausrechnung in folgende Rechenschritte:
Beispiel (α = 0.2752)

A	log A	S	log S	log A + log S + log α = log Z	log 0.1195 + log S = log b
349	2.54283	12.40	1.09350	3.07598	0.17093

b = log B und log 1 - log B = log $\frac{1}{B}$	$\frac{1}{B}$ und $1 - \frac{1}{B} = N$	log N	log Z - log N = log $\overset{\infty}{A}$	$\overset{\infty}{A}$
0.5171-2	0.96711	0.98347-1	3.09051	1231.7

Die Aktivität (A bzw. $\overset{\infty}{A}$) muss mit einem Faktor korrigiert werden, der die Verdünnung des Bariumcarbonats durch den Leerwert der Verbrennung berücksichtigt. Sie wurde nach folgendem Beispiel zur Ermittlung der molspezifischen Aktivitäten eingesetzt:

$Ba^{14}CO_3$ mg	$Ba^{14}CO_3$ mMol	S [mg/cm²]	A [Imp./Min.]	A_∞ [Imp./Min.]	Verdünnung (Divisor)
19.24	0.097	8.5	46	119	0.906

A_∞ (korrigiert) [Imp./Min.]	Imp./Min. / Mol
131	$13.5 \cdot 10^5$

3. Der prozentuale Anteil der Aktivität der einzelnen C-Atome an der des analysierten Ricininmoleküls

Er wurde aus den molspezifischen Aktivitäten nach folgendem Schema ermittelt:

$$(IV) \qquad A_x\% = \frac{n \cdot A_x \cdot 100}{8 \cdot A_{Ric}}$$

dabei bedeutet $A_x\%$ den Prozentsatz, den die molspezifische Aktivität A_x des Bariumcarbonats aus der Verbindung x, - die n Kohlenstoffatome besitzt -, an der Aktivität des betreffenden Ricininpräparats hat. Die molspezifische Aktivität des Bariumcarbonats aus letzterem ist A_{Ric}. Ricinin besitzt 8 Kohlenstoffatome.

Beispiel: Aktivitätsanteil des Natriumpropionats (C-Atom 4, 5, 6), das beim Abbau aus Ricinin gewonnen wurde:

$$A_{Ric} = 174 \cdot 10^5 \frac{\text{Imp.}}{\text{Min.} \cdot \text{Mol}}; \qquad n = 3;$$

$$A_x = A_{Prop} = 156 \cdot 10^5 \frac{\text{Imp.}}{\text{Min.} \cdot \text{Mol}};$$

$$A_{Prop}\% = \frac{3 \cdot 156 \cdot 10^5 \cdot 100}{8 \cdot 174 \cdot 10^5} = 33.7$$

Also beträgt die Aktivität der C-Atome 4, 5 und 6 zusammen 34% des ganzen Ricininmoleküls.

C. Die Reaktionen des Ricininabbauverfahrens

Reaktion 1a: Abspaltung der O-Methylgruppe

495.5 mg (3.0 mMol) Ricinin versetzt man in einem 25 ml-Kolben mit 5 ml Wasser und 3.0 ml 2-n-NaOH-Lösung. Der Kolben wird mit einer Destillationsapparatur verbunden, die langsam mit Stickstoff durchströmt wird. Als Vorlage dient ein 40 ml-Dreihalskolben, der in Eiswasser eintaucht.

Der Destillationskolben wird in einem Ölbad erwärmt. Die Badtemperatur soll im Laufe von 10-15 Min. 130° erreichen und wird auf dieser Temperatur gehalten, bis die Destillation beendet ist.

Durch Ansäuern des Destillationsrückstandes mit Salzsäure fällt man die Ricininsäure in Form feiner Nadeln aus. Sie wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und braucht nicht umkristallisiert zu werden. Schmp. 296-298°. Ausbeute: 420 mg (2.8 mMol), 93% d. Th..

Reaktion 1b: Oxydation des Methanols.

Das methanolhaltige Destillat wird mit 3.0 g trockenem Oxydationsgemisch [+)] versetzt, der Kolben schnell, bei fortgesetzter Kühlung mit Gaseinleitungsrohr, Kühler und Tropftrichter versehen, und ein lebhafter N_2-Strom hindurchgeleitet. Der Tropftrichter ist mit 5 ml Verbrennungssäure [++)] gefüllt. Vom Kühler führt ein Rohr zu einer Waschflasche, die mit 700 mg trockenem Oxydationsgemisch [+)] und mit 3 ml Verbrennungssäure [++)] beschickt ist. Das angeschlossene Absorptionsgefäss enthält etwa 17 ml carbonatfreie ca. 1-n-NaOH.

Man lässt die Verbrennungssäure innerhalb von 5-10 Min. in das gekühlte Methanol eintropfen, ersetzt das Eisbad durch ein Ölbad und hält die Badtemperatur 5-10 Min. auf 100°. Aus der vorgelegten Natronlauge fällt man das Carbonat bei 45° mit 15 ml Bariumchloridlösung [+++)].
Ausbeute: 2.6 mMol (87% d. Th.) Bariumcarbonat.

Reaktion 2: Abspaltung und Oxydation der Nitrilgruppe

30 mg (0.2 mMol) Ricininsäure oder Dihydroricininsäure werden in einem 20 ml Dreihalskolben mit 3 ml Wasser und 250 mg Kaliumdichromat im Stickstoffstrom zum Sieden erhitzt. Der Kolben ist mit Gaseinleitungsrohr und Tropftrichter versehen; in der Vorlage befinden sich 5 ml 5-n-NaOH.

+) $KJO_3/K_2Cr_2O_7$ (Gewichtsverhältnis 2:1).
++) 67.0 ml H_2SO_4 + 33.0 ml H_3PO_4 + 1.0 g KJO_3.
+++) 0.5-n-$BaCl_2$ in 0.4-n-NH_4Cl.

In die siedende Lösung gibt man im Laufe einer Stunde tropfenweise 3 ml konz. H_2SO_4 und erhitzt danach noch weitere 4 Stdn. im Stickstoffstrom.

Der Inhalt der Vorlage wird mit 5 ml Wasser in einen 50 ml-Kolben gespült, mit 100 mg - vorher mit Nassverbrennungsgemisch[15] behandelter - Kieselgur versetzt und das Gemisch in Eiswasser gekühlt. Nacheinander fügt man 5 ml 0.1-n-Silbernitratlösung und 15 ml 2-n-Salpetersäure zu und bewahrt das verschlossene Gefäss 2 Stdn. im Kühlschrank auf. Der Silbercyanidniederschlag wird über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute etwa 88% d. Th..

Bei Nassverbrennung erhält man daraus Bariumcarbonat in 92 proz. Ausbeute.

Reaktion 3: Hydrierung von Ricininsäure

300 mg (2.0 mMol) Ricininsäure werden, in 100 ml Wasser und 2.0 ml 1.0-n-Natronlauge gelöst, bei 20-22° nach und nach so mit Natriumamalgam versetzt, dass sich immer unzersetztes Amalgam im Ansatz befindet. Das Gemisch wird 6 Stdn. gerührt. Die Lösung ist gegen Ende schwach basisch (etwa 1-n). Sie wird mit 6-n-Salzsäure auf p_H 6.8-7.1 gebracht und nach Dekantieren vom Quecksilber und Filtrieren bei < 50° auf 60-70 ml eingeengt. Beim Ansäuern fällt Dihydroricininsäure aus. Man kühlt (0-4°) wenigstens 30 Min., filtriert sie dann ab und löst sie erneut wie oben. Der Ansatz wird noch einmal etwa 3 Stdn. mit Natriumamalgam gerührt.

Das über P_2O_5 getrocknete Endprodukt wird mit kaltem Methanol digeriert, die alkoholische Lösung bei < 40° zur Trockene gebracht: Dihydro-ricininsäure-Fraktion 1, farblose Kristalle, Schmp. 236° (Zers.); Ausbeute 35-45% d. Th..

Reaktion 4a/b: Oxydative Ringöffnung und Hydrolyse von XI

304 mg (2.0 mMol) 5.6-Dihydro-ricininsäure löst man in einem Dreihalskolben in 2.0 ml carbonatfreier etwa 1-n-Natronlauge und etwa 5 ml Wasser. Der Kolben trägt ein N_2-Einleitungsrohr, einen Tropftrichter und eine Verbindung zu 3 hintereinandergeschalteten Absorptionsgefässen, die je 14 ml carbonatfreie 1- bis 2-n-Natronlauge enthalten. Die ganze Apparatur passiert ein langsamer Stickstoffstrom. Innerhalb von 75 Min. lässt man 20.0 ml (4.0 mMol) 1.0-n-$KMnO_4$-Lösung unter magnetischem Rühren und Eiskühlung eintropfen. Die Lösung behält während der Umsetzung p_H 8.5-8.7. 45-60 Min. nachdem alles Permanganat reduziert worden ist, filtriert man den Braunstein über Kieselgur ab, wäscht mit 10-15 ml carbonatfreiem Wasser nach und überführt die Lösung wieder in den Kolben. Die Absorptionsgefässe bleiben unterdessen weiter unter Stickstoffatmosphäre.

Der Kolben trägt nun neben Tropftrichter und N_2-Einleitungsrohr einen senkrechten und daran anschliessend einen absteigenden Kühler. In der Vorlage befinden sich etwa 20 ml eisgekühltes carbonatfreies Wasser. Hat man in der Apparatur die Luft völlig durch Stickstoff verdrängt, so verbindet man den Vorstoss mit den Absorptionsgefässen der Oxydationsreaktion und lässt langsam 12-n-Salzsäure in die Lösung des primären Oxydationsprodukts (XI) eintropfen. Gleichzeitig ersetzt man den Stickstoffstrom durch Sauerstoff. Ist alle Salzsäure zugegeben, erhitzt man das Reaktionsgemisch zunächst 2 Stdn. unter Rückfluss und destilliert schliesslich den grössten Teil der Lösung innerhalb von $2\frac{1}{2}$ Stdn. wieder unter Stickstoff ab. In den Absorptionsgefässen wird das in der Reaktion freigesetzte Kohlendioxyd mit Bariumchloridlösung bei 45° gefällt. Ausbeute 95-110% d.Th..

Den Destillationsrückstand bringt man in einem kleinen Kölbchen zur Tockene. Er enthält Oxalsäure und N-Methyl-β-alanin-hydrochlorid und ist mit Tryptamin Schwefelsäure glyoxylsäurepositiv.

Trennung von Oxalsäure und N-Methyl-β-alanin an DOWEX-50: Man stellt sich aus 30 ml DOWEX-50x4(20-40 mesh), H^+-Form eine Säule her. Auf diese bringt man die Lösung des Destillationsrückstandes in höchstens 10 ml Wasser und eluiert solange mit Wasser, bis das Eluat nicht mehr sauer reagiert: Eluat I. Die Tropfgeschwindigkeit soll hierbei 20-30 Tropfen pro Stunde betragen. Sie wird beibehalten, wenn man anschliessend mit 150 ml 2.5-n-Salzsäure eluiert: Eluat II.

Eluat I: Aus diesem wird Oxalsäure mit 5 ml Calciumnitratlösung [+)] gefällt, indem man zur warmen Lösung 5-n-Kalilauge zutropfen lässt, bis Methylrot gerade nach gelb umschlägt, und noch solange auf 70° erwärmt, bis der Niederschlag gut filtierbar ist. Ausbeute 65-78% d.Th..

Eluat II bringt man i.Vak. zur Trockene und extrahiert den Rückstand mehrmals mit 96proz. Äthanol. Die alkoholische Lösung enthält das N-Methyl-β-alanin. Sie wird in das später zur Methylierung verwendete Gefäss übergeführt und der Alkohol abdestilliert. Den Rückstand versetzt man mit 1 ml 2-n-Natronlauge und trocknet diese im Exsiccator ein.

Reaktion 5: Überführung von N-Methyl-β-alanin in Acrylsäure und Trimethylamin

1.5 mMol N-Methyl-β-alanin schüttelt man bei Zimmertemperatur etwa 8 Stdn. mit 2 ml Wasser, 3 ml 1-n-Natronlauge, 350 mg CaO und 10 mMol Dimethylsulfat. Darauf wird das Reaktionsgemisch auf -80° gekühlt und noch

---

+) 1-n-Calciumnitrat in 2-n-Ammoniumchlorid

einmal 0.75 ml 2-n-Natronlauge und 1 ml Dimethylsulfat zugegeben. Nach 5-6stündigem Schütteln wird das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser in eine Wasserdampfdestillationsapparatur gebracht, etwa 3 ml 5proz. Schwefelsäure zugesetzt und die Acrylsäure in vorgelegte 10 ml n/10-Natronlauge überdestilliert. Die Acrylsäureausbeute kann durch Titration bestimmt werden: praktisch 100% d. Th.. Berechnet man die Ausbeute auf Dihydro-ricininsäure, so findet man etwa 65% d. Th..

Den Rückstand der Wasserdampfdestillation neutralisiert man mit 2-n-Natronlauge (Phenolphthalein) und gibt eine Lösung von 600 mg Reinecke-Salz in 100 ml Wasser zu. Das Tetramethylammoniumreineckat wird abzentrifugiert, 6mal mit Wasser gewaschen und über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 1.42 mMol (95% d. Th.) Reineckat (Ausbeute bezogen auf Dihydro-ricininsäure nicht zu ermitteln, da konstante Menge Reineckesalz, die z. T. überschüssig war, zur Fällung verwendet wurde).

Reaktion 6: Hydrierung der Acrylsäure

Etwa 60 mg PtO_2 werden in 10 ml Wasser vorhydriert, die Acrylsäure, in einer äquivalenten Menge n/10-Natronlauge gelöst, zugegeben und die Hydrierung bei Zimmertemperatur/1 at ausgeführt. Die Wasserstoffaufnahme ist meistens nach etwa 20 Min. beendet. Die filtrierte, eingeengte Lösung überführt man in ein Warburg-Gefäss und bringt es darin, zunächst über P_2O_5, später bei 130° zur Trockene. Ausbeute an Natriumpropionat quantitativ.

Das eingeengte Filtrat kann nach Zusatz von 2 ml 57proz. Schwefelsäure mit Wasserdampf destilliert und die Propionsäuremenge titrimetrisch ermittelt werden.

Reaktion 7 bis 9: Abbau der Propionsäure nach Phares[22]

(Schmidt'scher Abbau) zu 2mal CO_2 (C-4 und C-5) und Methylamin.
Das Methylamin wird mit 2.5-3 ml 10-n-Natronlauge wasserdampfdestilliert. Die gekühlte Vorlage enthält dabei 20 ml n/10-Salzsäure. Nach Verdampfen des Lösungsmittels: Methylammoniumhydrochlorid in 50proz. Ausbeute.

Reaktion 10: Methylierung des Methylamins (C-6)

Man versetzt 1.0 mMol Methylammoniumhydrochlorid in 2 ml Wasser und 2 ml 2-n-Natronlauge mit 6.7 mMol Dimethylsulfat. Letzteres wird im Laufe von 2 Stdn. allmählich unter Rühren zugegeben. Das Tetramethylammonium-Ion fällt man aus der Lösung durch Zugabe von 600 mg Reinecke-Salz in 100 ml Wasser als Reineckat. Ausbeute praktisch quantitativ.

D. Versuche zur Synthese und zum kontrollierten Abbau von Ricinin und 5.6-Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C]

Versuch 1: Methylierung von Ricininsäure

Man versetzte eine Suspension von 1 g (6.6 mMol) Ricininsäure in 40 ml Methanol bei 0° langsam mit 140 ml ätherischer, aus 85 mMol Nitrosomethylharnstoff hergestellter, Diazomethan-Lösung. Das Reaktionsgemisch liess man 3 Stdn. bei 0-4° stehen und brachte es nach Entfernung des Diazomethanüberschusses mit 10 proz. Eisessig in Äther i. Vak. zur Trockene. Der in 150 ml Chloroform gelöste Rückstand passierte eine Al_2O_3-Säule (neutral, Akt. 1). Aus dem Eluat isolierte man schwach gelbliche Kristalle, daraus nach Umkristallisieren aus Wasser 899 mg (5.4 mMol) Ricinin, Schmp. 193-195° (82% d.Th.).

Versuch 2: Ricininsäure-[2.4-^{14}C] wurde von U. SCHIEDT entsprechend Reaktionsschema III, S. 14, aus Cyanessigsäure-[1-^{14}C] dargestellt. Für die folgenden Versuche stand nur der Rückstand der Mutterlauge dieser Umsetzung zur Verfügung. Er wurde papierchromatographisch auf radiochemische Einheitlichkeit geprüft:

Aktivitätsverteilung in einem Papierchromatogramm des Ricininsäure-[2.4-^{14}C]-Präparats (spezif. Akt. etwa 2000 $\frac{\text{Imp./Min.}}{\text{mg}}$):

50 γ der Substanz, gelöst in 0.05 ml Methanol, trug man in einem runden Flecken von 1 cm Durchmesser auf Whatman-Papier Nr. 1 auf und chromatographierte nach der aufsteigenden Methode in n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) bis die Front 30 cm hoch gelaufen war. Der Streifen wurde in 2 cm Breite ausgeschnitten und dieser in 1 cm lange Abschnitte zerlegt. Ihre Radioaktivität wurde in einem Fensterzählrohr ermittelt, wobei man die Zeit für je 100 Imp. registrierte. Aus 3 Parallelmessungen erhielt man die Kurve Abb. 6. Der Leerwert betrug 11.6 Imp./Min.. Aus Abb. 6 ist zu ersehen, dass die chromatographierte Substanz neben Ricininsäure-[^{14}C] eine radioaktive Verunreinigung: Norricinin-[^{14}-C], enthielt. Diese liess sich durch Umkristallisieren nicht entfernen. Man war daher gezwungen, eine Trennung an Al_2O_3 vorzunehmen, die durch die sehr geringe Löslichkeit der Substanzen in wasserfreiem Alkohol und den meisten organischen Lösungsmitteln erschwert war.

Versuch 3: Reinigung synthetischer Ricininsäure

2.8 g der Substanz wurden in Tetrahydrofuran - in anderen Fällen in wässr. Methanol - gelöst und über eine Al_2O_3-Säule (3 · 30 cm), neutral, Akt. 4, geschickt. Durch Eluieren mit Methanol/Wasser (5:2) erhielt man 2400 ml Lösung, aus der 1.4 g reine Ricininsäure isoliert wurden (50% der eingesetzten Menge).

Die so an inaktivem Material ausprobierte Methode wurde auf das in Versuch 2 besprochene Ricininsäure-[^{14}C]-Präparat angewendet: 177.2 mg lieferten 88.2 mg reine Ricininsäure-[2.4-^{14}C].

Der Nachweis der Reinheit wurde papierchromatographisch und spektrophotometrisch geführt.

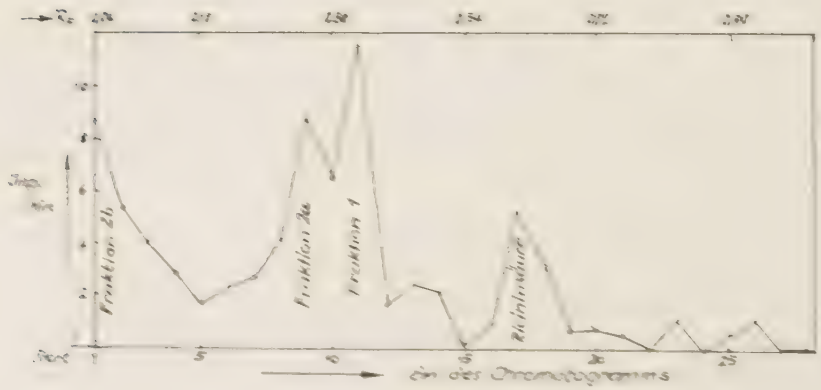
Versuch 4: Hydrierung der gereinigten Ricininsäure-[2.4-^{14}C]:

38.2 mg der radioaktiven Ricininsäure (aus Versuch 3) vermischte man mit 417.3 mg inaktiver (zusammen 3 mMol Ricininsäure). Man hydrierte mit Natriumamalgam (Reaktion 8) und erhielt zunächst 414 mg Hydrierungsprodukt, das analog Versuch 2 papierchromatographiert wurde. Das Ergebnis der Aktivitätsmessung ist in der Kurve Abb. 12 dargestellt. Der Leerwert betrug 11.0 Imp./Min.. Obwohl eine ausserordentlich niedrige Impulsrate registriert wurde, lassen sich mehrere Maxima der Aktivitätsverteilung erkennen. In einem Parallelchromatogramm betrugen die Wanderungsgeschwindigkeiten:

Ricininsäure	R_F	= 0.60
Fraktion 1		= 0.41
(5.6-Dihydroricininsäure)		
Fraktion 2a		= 0.31
Fraktion 2b		= 0.02

Nach wiederholter Hydrierung erhielt man 268.3 mg praktisch ricininsäurefreies Hydrierungsprodukt, das zur Gewinnung der Dihydro-ricininsäure noch zu reinigen war.

Abb. 12 Akt.-Verteilung auf einem Papierchromatogramm der Hydrierungsprodukte von Ricininsäure-[2.4-^{14}C]



Versuch 5: Fraktionierung der Hydrierungsprodukte von Ricininsäure:
Man digerierte die Substanz mit kaltem Methanol. Die alkoholische Lösung wurde bei $< 28^{\circ}$ zur Trockene gebracht, der Rückstand aus Methanol umkristallisiert: Fraktion 1, farblose Kristalle, Schmp. 236-238°(Zers.),

$C_7H_8O_2N_2$ (152.16)	ber.	C 55.23	H 5.30	N 18.41
	gef.	C 55.47	H 5.23	N 18.46

Den in kaltem Methanol schwer löslichen Rückstand suspendierte man in Wasser von Zimmertemperatur: löslich Fraktion 2a, unlöslich Fraktion 2b.

Aus der wässrigen Lösung durch Einengen: Fraktion 2a, nach Umkristallisieren aus Wasser farblose Kristalle, Schmp. 246-247°(Zers.).

Der in Wasser unlösliche Anteil wurde mehrmals umgefällt - gelöst in Natronlauge, gefällt mit HCl - : Fraktion 2b, farblose amorphe Substanz, Schmp. 309-310°(Zers.).

Fraktion 1 und 2a wandern bei Hochspannungselektrophorese in 0.2-m-Phosphatpuffer von p_H 8.25 anodisch, getrennt als 2 scharfe Banden, von denen die schneller wandernde der Fraktion 2a zuzuordnen ist.

Mit den 3 Fraktionen wurde das Papierchromatogramm Abb. 13 hergestellt. Man chromatographierte nach der aufsteigenden Methode an Schleicher u. Schüll-Papier 2043a in n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1). Unter diesen Bedingungen betragen die Wanderungsgeschwindigkeiten:

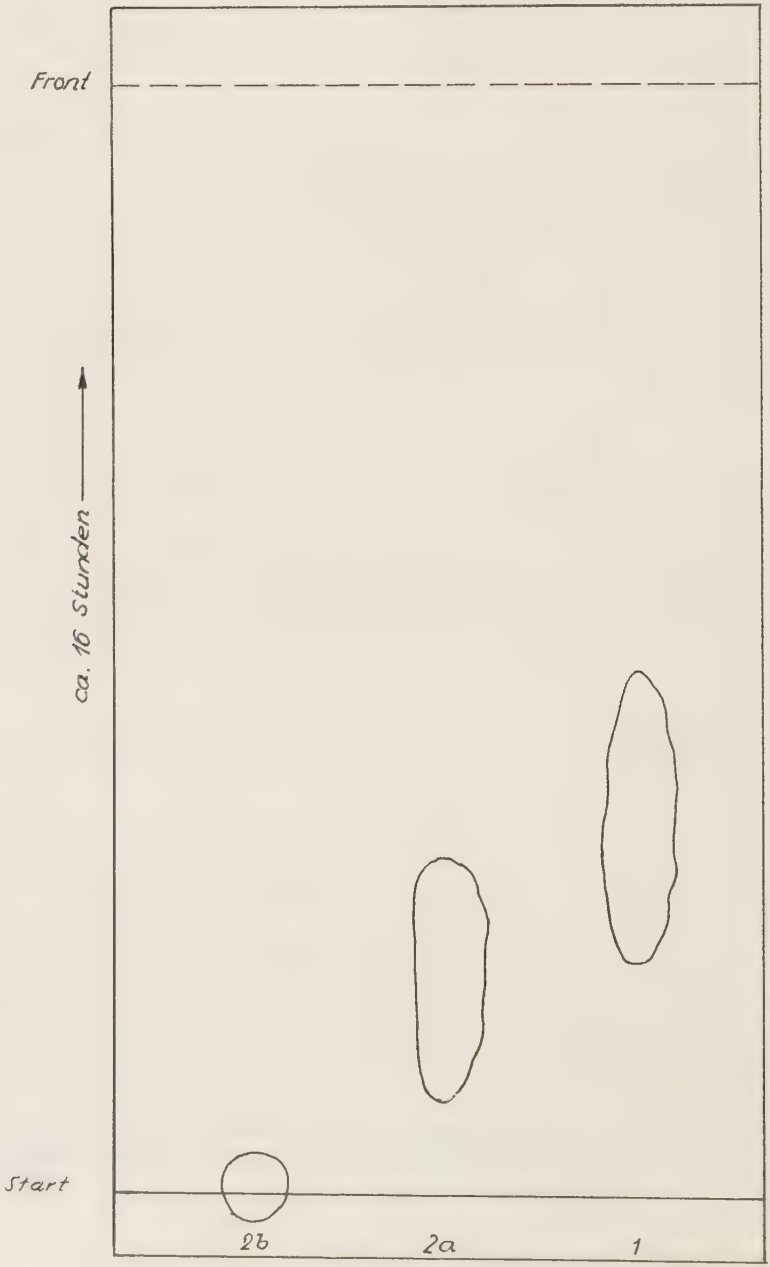
Ricininsäure	R_F = 0.65
Fraktion 1 (5.6-Dihydroricininsäure)	= 0.47
Fraktion 2a	= 0.28
Fraktion 2b	= 0.02

Die Titrationskurven der Fraktionen decken sich praktisch (daraus abgelesen: p_K 3.1) und unterscheiden sich wenig von der der Ricininsäure (p_K 3.5).

Die in Natronlauge aufgenommenen UV-Spektren der Hydrierungsprodukte lassen gegenüber den in Wasser - oder Puffer von p_H 6.5 - gemessenen keine Rotverschiebung und Erhöhung der Extinktionen der Maxima erkennen. Ricininsäure-Spektren zeigen dagegen den erwarteten Effekt (Tab. XVII). Die IR-Spektren aller 3 Fraktionen weisen die CN-Bande (4.48 μ) auf.

Aus den 258.3 mg radioaktiven Hydrierungsprodukts von Versuch 4 wurden bei Fraktionierung gewonnen: 106.0 mg Fraktion 1; 9.2 mg Fraktion 2a; 54.3 mg Fraktion 2b.

Abb. 13 Papierchromatogramm der Hydrierungsprodukte von Ricininsäure



Tab. XVII Daten der Hydrierungsprodukte von Ricininsäure

	Ricinin-säure	Fraktion 1	Fraktion 2a	Fraktion 2b
Schmp. (Zers.)	296-298°	236-238°	246-247°	309-310°
R_F	0.65	0.47	0.28	0.02
Löslichkeit	wenig löslich MeOH	leicht löslich MeOH u. H_2O	schwer löslich MeOH, leicht löslich H_2O	schwer löslich MeOH u. H_2O
p_K	3.5	3.1	3.1	
UV-Spektren	in Äthanol mμ	in H_2O mμ	in H_2O mμ	
λ_{max} (log ε)	219(4.43)			
λ_{max} (log ε)	254(3.45)	218(4.25)	217(4.29)	
λ_{max} (log ε)	305(3.83)	274(4.02)	275(4.07)	
	in n/10-NaOH			
λ_{max} (log ε)	220(4.62)	219(4.26)	220(4.24)	221(4.27)
λ_{max} (log ε)	279(3.90)	274(4.04)	274(4.08)	276(3.96)

Versuch 6: Abbau von 5.6-Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C]

Dieser Versuch ergab die in Tab. XIX angeführten Ausbeuten der Spaltprodukte. Der 1. Abbau (Probe I) wurde mit 307 mg (2.02 mMol), der 2. Abbau (Probe II) mit 286 mg (1.88 mMol) Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C] durchgeführt. Die Isotopenmessergebnisse zeigt Tab. XVIII an.

Ein 3. Abbau ist unter geringfügig anderen Bedingungen von U. SCHIEDT durchgeführt worden. Dabei wurde von 254 mg (1.67 mMol) Dihydroricininsäure-[2.4-^{14}C] ausgegangen, deren Aktivität durch Verbrennung der Vorstufe Ricininsäure-[2.4-^{14}C] bekannt war. Um zu zeigen, dass C-8 unmarkiert (Reaktion 2) und C-4 in erwarteter Höhe markiert waren, werden die Ergebnisse hier in Tab. XX angegeben.

Tab. XIX Ausbeuten beim Abbau von Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C]

Verbindung	Probe I 1. Abbau	Probe II 2. Abbau
Bariumcarbonat (C-8, 3, 2)	108% d. Th.	102% d. Th.
Calciumoxalat (C-2, 3, 8)	65% d. Th.	78% d. Th.
Acrylsäure (C-4, 5, 6)	–	99% d. Th.
Tetramethylreineckat (C-7)	89% d. Th.	–

E. Versuche mit radioaktiven Ricininvorstufen und Abbau der Ricinin-[^{14}C]-Präparate

1. Lysin-[^{14}C]

Stammlösung: 1 mg L-Lysin-[^{14}C] (uniform markiert), absol. Aktivität 0.1 mC, gelöst in 5 ml Wasser zusammen mit 21.9 mg L-(+)-Lysin-dihydrochlorid und 16.8 mg Natriumbicarbonat.

Injektion [+)] und Ricininisolierung: 48 Keimlingen wurden im 7-Tage-Stadium insgesamt 1.4 ml der Stammlösung, relat. Aktivität $25 \cdot 10^6$ Imp./Min., verabreicht. Nach 8 Tagen erntete man die Pflanzen, trocknete sie bei 60° und isolierte 292 mg Ricinin, direkt bestimmte spezif. Aktivität 95 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: 190 mg (1.17 mMol) "Ricinin-Lysin-[^{14}C] [++)] ergaben 155.6 mg (1.02 mMol) Ricininsäure und Methanol, von dem nach Oxydation 115.6 mg (0.58 mMol) Bariumcarbonat erhalten wurden. Die Nitrilgruppe untersuchte man 2mal: aus 28.70 mg (0.19 mMol) Ricininsäure Silbercyanid, das 12.00 mg (0.06 mMol) Bariumcarbonat lieferte; aus 25.14 mg (0.16 mMol) Ricininsäure 20.0 mg (0.10 mMol) Bariumcarbonat (C-8). Die Ermittlung der Aktivitätsverteilung zeigt Tabelle XXI. Die spezif. Aktivität des Bariumcarbonats aus Silbercyanid weist gute Übereinstimmung zwischen beiden Präparaten auf.

[+)] Die Injektion wurde mit einer "Insulinspritze" (1 ml unterteilt in 100 Teilstriche) und der Stahlnadelstärke 2 durchgeführt.

[++)] "Ricinin-Lysin-[^{14}C]" und die weiter unten folgenden analogen Bezeichnungen sollen jeweils für das Ricinin aus dem Versuch mit einer bestimmten Ricininvorstufe, hier Lysin-[^{14}C], stehen.

2. Glutaminsäure-[1-^{14}C]

Stammlösung: 6.3 mg DL-Glutaminsäure-[1-^{14}C], absol. Aktivität 0.1 mC, gelöst in 100 ml Wasser zusammen mit 94 mg L-Glutaminsäure und 57.3 mg Natriumbicarbonat.

Applikation und Ricininisolierung: Man verfütterte an 97 Keimlinge im 9-Tage-Stadium je 1 ml der Stammlösung, relat. Aktivität 87 · 10^6 Imp./Min., und isolierte nach 9 bzw. 11 Tagen 94.6 mg Ricinin, spezif. Aktivität 348 Imp./Min. · mg und 353.0 mg Ricinin spezif. Aktivität 416 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: wurde mit 625.7 mg (3.8 mMol) Ricinin (Mischung aus 447.6 mg "Ricinin-Glutaminsäure-[1-^{14}C]" und 194.5 inakt. Ricinin) begonnen und auf der Stufe der Dihydro-ricininsäure um den Faktor 1.28 mit inaktivem Material verdünnt. Das in Reaktion 4 a/b freigesetzte Bariumcarbonat wurde nicht aufgefangen.[x]

Die Ermittlung der Aktivitätsverteilung gibt Tab. XXII an. Die Auswertung der Impulszählung von Präparaten gleichen Ursprungs aber verschiedener Schichtdicke zeigt hier und in späteren Tabellen die gute Anwendbarkeit der Methode der Selbstabsorptionskorrektur.

3. Glutaminsäure-[2-^{14}C]

Injektion und Ricininisolierung: 79 Keimlingen wurde insgesamt eine Lösung von 39 mg DL-Glutaminsäure-[2-^{14}C], relat. Aktivität 88 · 10^6 Imp./Min., und 22 mg Natriumbicarbonat in 0.80 ml Wasser injiziert. Ricininausbeute: 418 mg, spezif. Aktivität 1770 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: 764.7 mg (4.65 mMol) Ricinin (252.3 mg "Ricinin-Glutaminsäure-[2-^{14}C]" und 520.5 mg inakt. Ricinin gelöst in Chloroform, anschliessend Lösungsmittel verdampft) ergaben 651.1 mg (4.35 mMol) Ricininsäure und 799.7 mg (4.06 mMol) Bariumcarbonat aus Methanol (C-9). In Reaktion 2 wurden aus 27.58 mg (0.184 mMol) Ricininsäure 11.55 mg (0.058 mMol) Bariumcarbonat von der Nitrilgruppe (C-8) gewonnen. Reaktion 3: 611 mg (4.10 mMol) Ricininsäure lieferten bei einmaliger Hydrierung 515 mg (3.3 mMol) ricininsäurefreie Dihydro-ricininsäure. Reaktion 4: 500 mg (3.3 mMol) Dihydro-ricininsäure wurden oxydativ aufgespalten in 168.7 mg (0.86 mMol) Bariumcarbonat (C-8, 3, 2), 328.8 mg (2.35 mMol) Calciumoxalat und N-Methyl-β-alanin. Die Bariumcarbonatausbeute war hier gering, weil der aufsteigende Kühler ein kleines Loch hatte. Da aber in der Apparatur wegen der ständigen Stickstoff-Durchspülung immer ein schwacher Überdruck herrscht, ist nicht anzunehmen, dass das Bariumcarbonat über den üblichen Leerwert hinaus durch Luft-Kohlensäure verdünnt worden ist. Reaktion 5-8: Das N-Methyl-β-alanin wurde nach Permethylierung

in Trimethylamin (Reineckat) und Propionsäure übergeführt. Aus letzterer erhielt man beim Schmidt-Abbau 316.8 mg (1.61 mMol) Bariumcarbonat von C-4 und, nach Oxydation des Äthylamins, 1.66 mMol Essigsäure. Reaktion 9: Nochmaliger Schmidt-Abbau brachte 159.7 (0.81 mMol)Bariumcarbonat von C-5 sowie Methylamin.

Die Ermittlung der Aktivitätsverteilung ist aus Tab. XXIII ersichtlich.

Mit Hilfe der auf S. 19-22 abgeleiteten Gleichungen berechnen sich die Aktivitäten der C-Atome 2 und 3 wie folgt:

(10) $A_3 = 3.24 \cdot 48.3 - 3.07 \cdot 152.1 + 0.83 \cdot 332$

$= 156.5 - 466.9 + 275.6$

$= - 34.8$ (die negativen Werte erklären sich durch Multiplikation und Addition kleiner Zählfehler)

$A_3 = 0$

(8) $A_2 = 2.33 \cdot 152.1 - 0.47 \cdot (- 34.8) - 0.86 \cdot 332$

$A_2 = 85.2$

also ist A_3 unmarkiert, A_2 weist eine spez. Aktivität von $85.2 \cdot 10^5$ Imp./Min. · Mol auf; es enthält somit 15% der Aktivität des Ricinins.

4. Asparaginsäure-[3-^{14}C]

Präparat: DL-Asparaginsäure-[3-^{14}C]-mono-Natriumsalz, relat. spezif. Aktivität $2.57 \cdot 10^5$ Imp./Min. · mg

Injektion und Ricininisolierung: 55 Keimlingen applizierte man im 8-Tage-Stadium insgesamt eine Lösung von 128 mg DL-Asparaginsäure als mono-Natriumsalz, Aktivität $32.8 \cdot 10^6$ Imp./Min.. Die Pflanzen wurden nach 10 Tagen geerntet, bei 120° getrocknet und 200 mg Ricinin, spezif. Aktivität 1600 Imp./Min. · mg, isoliert.

Ricininabbau: Das "Ricinin-Asparaginsäure-[3-^{14}C]" wurde mit inakt. Ricinin verdünnt. Reaktion 1: 592.7 mg (3.61 mMol) Ricinin lieferten 509.9 mg (3.40 mMol) Ricininsäure und 231.6 mg (1.17 mMol) Bariumcarbonat aus Methanol (C-9). Reaktion 2: aus 29.53 mg (0.197 mMol) Ricininsäure wurde Silbercyanid, daraus 32.85 mg (0.167 mMol) Bariumcarbonat, dargestellt. Reaktion 3: 464 mg (0.31 mMol) Ricininsäure ergaben nach erster Hydrierung 372.5 mg (ca. 2.5 mMol) Hydrierungsprodukt. Dieses lieferte bei wiederholter Hydrierung 294.5 mg (1.93 mMol) Dihydroricininsäure. Reaktion 4: Bei Oxydation von 294 mg (1.9 mMol) Dihydroricininsäure gewann man 351.3 mg (1.8 mMol) Bariumcarbonat (C-8, 3, 2) sowie 203.3 mg (1.5 mMol) Calciumoxalat und N-Methyl-β-alanin.

Nach Hydrierung der Acrylsäure (Reaktion 6) ging ein grosser Teil der Propionsäurelösung verloren. Von C-4 wurden 24.66 mg (0.13 mMol) Bariumcarbonat, von C-5 23.38 mg (0.12 mMol) Bariumcarbonat erhalten, wodurch die Aktivität dieser C-Atome bestimmt werden konnte. C-6 isolierte man in 23.53 mg (0.06 mMol) Tetramethylammoniumreineckat, dessen Aktivitätswert nicht so sicher ist wie sonst, da der Niederschlag nicht gewaschen wurde.

Die Ermittlung der Aktivitätsverteilung ist aus Tab. XXIV zu ersehen.

Mit Hilfe der auf S. 19-22 abgeleiteten Gleichungen berechnen sich die spezif. Aktivitäten der C-Atome 2 und 3 wie folgt:

(10) $A_3 = 3.24 \cdot 110.6 - 3.07 \cdot 67.0 + 0.83 \cdot 84.2$
$= 222.5$

(8) $A_2 = 2.33 \cdot 67.0 - 0.47 \cdot 222.5 - 0.86 \cdot 84.2$
$= 156.1 - 104.6 - 72.4$
$= -20.9$
$A_2 = 0$

also ist A_2 praktisch unmarkiert. A_3 weist eine spezif. Aktivität von $222.5 \cdot 10^5$ Imp./Min. · Mol auf; es enthält somit 42% der Aktivität des Ricinins.

5. Acetat-[1-^{14}C]

Präparat: Natriumacetat-[1-^{14}C], absol. spezif. Aktivität 1 mC pro mMol.

a) Injektion und Ricininisolierung: 50 Keimlingen injizierte man im Alter von 8-10 Tagen insgesamt eine wässrige Lösung von 11 mg Natriumacetat-[1-^{14}C], relat. Aktivität $119 \cdot 10^6$ Imp./Min.. Nach 7-9 Tagen erntete man die Pflanze, trocknete sie bei 120-130° und isolierte 242.5 mg Ricinin, spezif. Aktivität 2690 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: wurde mit 642.2 mg Ricinin (Mischung von "Ricinin-Acetat-[1-^{14}C]" und 407.7 mg inakt. Ricinin) begonnen. Auf der Abbaustufe der Dihydroricininsäure verdünnte man das Material um den Faktor 1.235 mit inaktiver Substanz. Das Bariumcarbonat (C-8, 3, 2) aus Reaktion 4 a/b wurde nicht bestimmt.[x]

Die Ermittlung der Aktivitätsverteilung ist aus Tab. XXV zu ersehen.

b) Verfütterung und Ricininisolierung: 19 Keimlingen wurde mit der Nährlösung 3.2 mg Natriumacetat-[1-^{14}C], relat. Aktivität $35 \cdot 10^6$ Imp./Min. angeboten. Nach 9 Tagen isolierte man 58 mg Ricinin, spezif. Aktivität 372 $\frac{\text{Imp. Min.}}{\text{mg}}$,

6. Acetat-[2-^{14}C]

Präparat: Natriumacetat-[2-^{14}C], absol. spezif. Aktivität 0,9 mC/mMol.

Injektion und Ricininisolierung: 97 Keimlingen - etwa 9 Tage alt - applizierte man insgesamt 21,3 mg Natriumacetat-[2-^{14}C], relat. Aktivität $207 \cdot 10^6$ Imp./Min., in 2,23 ml Wasser. Die Pflanzen wurden nach 9-12 Tagen geerntet. Ausbeute: 365 mg Ricinin spezif. Aktivität 9750 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: wurde mit 659 mg Ricinin (Mischung aus 365 mg "Ricinin-Acetat-[2-^{14}C]" und 686,4 mg inakt. Ricinin) durchgeführt. Das Bariumcarbonat (C-8, 2) aus Reaktion 4 a/b wurde nicht untersucht.[X]

Die Auswertung der Isotopenmessergebnisse gibt Tab. XXVI an.

7. Formiat-[^{14}C]

Präparat: Natriumformiat-[^{14}C], absol. spezif. Aktivität 1 mC/mMol.

Injektion und Ricininisolierung: 40 Keimlingen - 9 Tage alt - injizierte man insgesamt 9,8 mg Natriumformiat-[^{14}C], relat. Aktivität $163 \cdot 10^6$ Imp./Min., in 0,9 ml Wasser. Man erntete die Pflanzen nach 8 Tagen. Ausbeute 166,6 mg Ricinin, spezif. Aktivität 21 350 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau wurde mit 1,337 g Ricinin (166,6 mg "Ricinin-Formiat-[^{14}C]" + 1,345 g inakt. Ricinin) durchgeführt.

Die Untersuchung der Aktivitätsverteilung zeigt Tab. XXVII.

8. Cyanid-[^{14}C]

Präparat: 49 mg Natriumcyanid-[^{14}C] + 40 mg NaOH, absol. Aktivität 1 mC.

Injektion und Ricininisolierung: 65 Keimlingen wurden insgesamt 8,2 mg Natriumcyanid-[^{14}C], relat. Aktivität $149 \cdot 10^6$ Imp./Min. [+)], in 0,80 ml Wasser injiziert. Ausbeute 306 mg Ricinin, spezif. Akt. 850 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: 224,3 mg "Ricinin-Cyanid-[^{14}C]" wurden zusammen mit 352,7 mg inakt. Ricinin in 3 ml Wasser aufgeschlämmt und wieder zur Trockene gebracht. Reaktion 1: 564 mg (3,44 mMol) Ricinin erbrachten 497 mg (3,31 mMol) Ricininsäure und 570 mg (2,80 mMol) Bariumcarbonat von C-9. Reaktion 2: aus 25,59 mg (0,171 mMol) Ricininsäure wurden 7,85 mg (0,04 mMol) Bariumcarbonat

+) von U. SCHMIDT angegeben: $80 \cdot 10^6$ Imp./Min., entspricht der Annahme, dass nur 20% der Zerfälle registriert werden.

von C-8 zur Messung gebracht. Reaktion 3: 493 mg (3.3 mMol) Ricininsäure lieferten 365 mg (2.4 mMol) Dihydroricininsäure, die in Reaktion 4 456.3 mg (2.3 mMol) Bariumcarbonat (C-8, 3, 2), 245.5 mg (1.68 mMol) Calciumoxalat und N-Methyl-β-alanin ergaben. Reaktion 5, 6: Man erhielt aus dem N-Methyl-β-alanin 1.79 mMol Propionsäure. Reaktion 7, 8: 0.24 mMol Propionsäure wurden dem Schmidt-Abbau unterworfen: 21.28 mg (0.108 mMol) Bariumcarbonat (C-4) und 0.17 mMol Essigsäure. Reaktion 9, 10: Schmidt-Abbau der Essigsäure zu 16.84 mg (0.085 mMol) Bariumcarbonat (C-5) und 30.85 mg (0.098 mMol) Tetramethylammoniumreineckat (C-6).

Die Aktivitätsverteilung zeigt Tab. XXVIII.

9. Bicarbonat-[^{14}C]

Herstellung der Bicarbonatlösung: Aus 166 mg Bariumcarbonat-[^{14}C], relat. Aktivität $146 \cdot 10^6$ Imp./Min., 1 ml 0.578-n-Natronlauge und 5 ml 40-proz. $HClO_4$-Lösung.[x]

Injektion und Ricininisolierung: 38 Keimlingen - 11 Tage alt - injizierte man zusammen die 6 ml Natriumbicarbonat-[^{14}C]-Lösung, Aktivität $146 \cdot 10^6$ Imp./Min.. Man erntete die Pflanzen nach 9 Tagen. Ausbeute: 188.5 mg Ricinin, spezif. Aktivität 2205 Imp./Min. · mg.

Ricininabbau: 165.8 mg "Ricinin-Bicarbonat-[^{14}C]" und 434.5 mg inakt. Ricinin schlämmte man in 3 ml Wasser auf und brachte die Mischung zur Trockene. Reaktion 1: 590.8 mg (3.61 mMol) Ricinin ergaben 522.6 mg (3.50 mMol) Ricininsäure und 151.2 mg (0.78 mMol) Bariumcarbonat (C-9). Reaktion 2: Aus 16.92 mg (0.114 mMol) Ricininsäure wurden 15.08 mg (0.077 mMol) Bariumcarbonat (C-8) erhalten. Reaktion 3: 503.4 mg (3.36 mMol) Ricininsäure wurden hydriert: 404.6 mg (2.62 mMol) Dihydroricininsäure. Reaktion 4: 401 mg (2.64 mMol) Dihydroricininsäure spaltete man oxydativ in 471 mg (2.40 mMol) Bariumcarbonat (C-8, 3, 2), 281.2 mg (1.94 mMol) Calciumoxalat und N-Methyl-β-alanin. Letzteres lieferte (Reaktion 5, 6) 0.62 mMol Propionsäure. Reaktion 7: Einen Teil des Natriumpropionats unterwarf man dem Schmidt-Abbau: 15.49 mg (0.07 mMol) Bariumcarbonat (C-4) und nach Oxydation des Äthylamins 0.08 mMol Essigsäure. Reaktion 9, 10: 7.65 mg (0.03 mMol) Bariumcarbonat (C-5) und 18.12 mg (0.047 mMol) Tetramethylammoniumreineckat.

Die Ermittlung der Aktivitätsverteilung ist aus Tab. XXIX ersichtlich.

Mit Hilfe der auf S. 19-22 abgeleiteten Gleichungen berechnen sich die Aktivitäten der C-Atome 2 und 3 wie folgt:

(10) $A_3 = 3.24 \cdot 59.1 - 3.07 \cdot 87.7 + 0.83 \cdot 78.1$
$= 191.5 - 269.2 + 64.8$
$= -12.9$
$A_3 = 0$

(8) $A_2 = 2.33 \cdot 87.7 - 0.47 \cdot (-12.9) - 0.86 \cdot 78.1$
$= 131.2$

also ist A_3 unmarkiert. A_2 weist eine spezif. Aktivität von $131.2 \cdot 10^5$ Imp./Min. · Mol auf, d.h., es enthält 19% der Aktivität des Ricinins.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Dunkelkeimlinge von Ricinus com. bilden das Ricinin in den Keimblättern.

Der Einbau von ^{14}C-markierten Acetaten, Aminosäuren und C_1-Verbindungen in das Ricinin wird durch Injektion dieser Vorstufen in den Raum zwischen Keimblättern und Nährgewebe 6-9 Tage alter Pflanzen studiert.

Ein stufenweiser chemischer Abbau des Ricinins wird beschrieben. Er gestattet weniger als 500 mg Ricinin auf die Verteilung der Radioaktivität im Molekül zu untersuchen.

Alle injizierten Verbindungen werden bei der Biosynthese des Ricinins ausgenützt. Auf Grund der Einbauraten und der Verteilung der Radioaktivität im Ricinin werden seine möglichen Vorstufen diskutiert. Es ist wahrscheinlich, dass der Pyridonring durch Kondensation mehrerer Vorstufen entsteht, die 4 oder weniger C-Atome enthalten.

V. ANHANG

Tabellen XVIII, XX - XXIX
Formelschema II
Abb. 7

Tabelle XVIII

Dihydro-ricininsäure-[2.4-^{14}C]

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	$BaCO_3$ auf plate mMol	mg / cm^2	$\overset{A}{\text{Imp.}}$ / Min.	$\overset{\infty}{A}$ Imp. / Min.	Verdünnung (D.visor)	$\overset{\infty}{A}_k$ Imp. / Min.	Imp. / Min. / Mol	% d. Akt. d. Ric.
1. Abbau (Probe I)										
Dihydro-ricininsäure	2-8	25.21	0.127	11.1	532	1706	0.916	1860	$146 \cdot 10^5$	100
		43.62	0.220	19.2	867	4608	0.953	4730	$220 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	8, 2, 3	5.77	0.029	1.9	529	682	0.860	794	$274 \cdot 10^5$	21.4
Calciumoxalat	2, 3, 8	15.51	0.078	6.8	759	1675	0.864	1940	$249 \cdot 10^5$	38.9
2. Abbau (Probe II)										
Dihydro-ricininsäure	2-8	18.93	0.095	8.3	819	2090	0.928	2170	$228 \cdot 10^5$	100
Kohlendioxyd	8, 2, 3	24.07	0.122	10.6	1255	3872	0.925	4180	$349 \cdot 10^5$	21.8
Calciumoxalat	2, 3, 8	29.19	0.147	12.9	1325	4830	0.978	4940	$336 \cdot 10^5$	42.1

Tabelle XX

Ricininsäure-[2.4-^{14}C] x)

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg / cm^2	A Imp. / Min.	$\mathring{A}$ Imp. / Min.	Verdünnung (Divisor)	$\mathring{A}_k$ Imp. / Min.	Imp. / Min. / Mol	% d. Akt. d. Ric.
3. Abbau										
Ricininsäure	2-8	34.42	0.174	12.5	425	1747	0.919	1902	$109 \cdot 10^5$	100
Silbercyanid	8	4.76	0.024	1.7	0	--	--	--	--	0.0
Calciumoxalat	2, 3, 8	22.82	0.116	8.3	488	1404	0.878	1600	$138 \cdot 10^5$	37.0
		56.05	0.284	20.4	589	3878	0.950	4075	$144 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	8, 2, 3	56.49	0.286	20.6	509	3381	ca. 0.90	3760	$132 \cdot 10^5$	17.2
Natriumpropionat	4, 5, 6	38.13	0.193	13.9	422	1908	0.927	2280	$107 \cdot 10^5$	41.9
Kohlendioxyd	4	15.43	0.078	5.6	1153	2495	ca. 0.90	2770	$355 \cdot 10^5$	49.8
		95.99	0.486	35.0	1554	17749	ca. 0.90	19700	$405 \cdot 10^5$	
TMA-Reineckat	7	31.21	0.080	11.4	16	60	--	--	$7 \cdot 10^5$	0.5

Tabelle XXI

"Ricinin-Lysin-[^{14}C] " (uniform markiert)

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg / cm^2	A Imp./Min.	$\bar{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\bar{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min./Mol	% d. Akt. d.Ric.
Ricinin	2-9	42.98	0.216	16.9	60	281	0.944	298	$13.8 \cdot 10^5$	100
Ricininsäure	2-8	60.93	0.306	23.9	66	436	0.905	482	$15.8 \cdot 10^5$	100
Methanol	9	111.98	0.564	51.7	16	228	0.975	234	$4.2 \cdot 10^5$	4
Silbercyanid	8	10.63	0.053	4.2	90	151	0.852	176	$33.2 \cdot 10^5$	30
		21.91	0.110	7.3	142	330	0.914	361	$32.8 \cdot 10^5$	

Tabelle XXII

"Ricinin-Glutaminsäure-[1-^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg / cm^2	A Imp./Min.	$\overset{\infty}{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\overset{\infty}{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min./Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	88.00	0.446	32.1	188	1948	0.919	2590	$47.5 \cdot 10^5$	100
Ricininsäure	2-8	53.58	0.271	19.5	167	1052	0.869	1210	$44.6 \cdot 10^5$	82
Methanol	9	48.37	0.245	17.6	45	256	0.968	265	$10.8 \cdot 10^5$	3
		50.83	0.258	18.5	43	257	0.968	266	$10.3 \cdot 10^5$	
		77.43	0.392	28.2	43	391	0.968	403	$10.1 \cdot 10^5$	
		88.30	0.448	32.2	47	487	0.968	503	$11.2 \cdot 10^5$	
Silbercyanid	8	30.08	0.152	11.0	299	1086	0.913	1190	$78.1 \cdot 10^5$	21
Calciumoxalat	2, 3, 8	50.93	0.257	18.6	66	391	0.745	525	$20.4 \cdot 10^5$	11
		51.12	0.258	18.6	64	384	0.745	516	$20.0 \cdot 10^5$	
Natriumpropionat	4, 5, 6	47.26	0.239	17.0	227	1247	0.743	1680	$70.4 \cdot 10^5$	55
Kohlendioxyd	4	39.53	0.200	14.4	60	281	0.761	369	$18.4 \cdot 10^5$	5
		51.50	0.261	18.8	72	436	0.761	573	$21.9 \cdot 10^5$	
Natriumacetat	5,6	19.42	0.099	7.1	187	473	0.515	919	$93.3 \cdot 10^5$	49
Kohlendioxyd	5	49.33	0.250	18.0	62	360	0.753	478	$19.2 \cdot 10^5$	6
		52.05	0.264	19.0	73	448	0.753	596	$22.6 \cdot 10^5$	
TMA-Reineckat	6	32.29	0.082	11.8	220	855	0.781	1093	$124.0 \cdot 10^5$	31
		36.36	0.093	13.2	201	867	0.781	1109	$119.8 \cdot 10^5$	
		43.56	0.111	15.9	184	948	0.781	1213	$109.9 \cdot 10^5$	
TMA-Reineckat	7	33.25	0.085	12.1	14	56	0.781	72	$8.5 \cdot 10^5$	3
		44.45	0.113	16.2	18	94	0.781	120	$10.6 \cdot 10^5$	

Tabelle XXIII

"Ricinin-Glutaminsäure-[2-^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	$BaCO_3$ auf plate mMol	mg / cm^2	A Imp./Min.	$\overset{\infty}{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\overset{\infty}{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min./Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	28.05	0.142	11.0	295	940	0.910	1032	$72.5 \cdot 10^5$	100
		51.40	0.261	20.2	294	1638	0.934	1755	$67.4 \cdot 10^5$	
Ricininsäure	2-8	19.90	0.101	7.8	279	679	0.925	734	$72.6 \cdot 10^5$	91
Methanol	9	34.24	0.175	11.5	35	115	0.995	116	$6.6 \cdot 10^5$	1
		39.62	0.201	13.3	34	127	0.995	128	$6.4 \cdot 10^5$	
Silbercyanid	8	15.37	0.078	6.8	842	1857	0.775	2390	$332.0 \cdot 10^5$	55
Calciumoxalat	2, 3, 8	20.44	0.102	6.8	185	411	0.834	493	$48.3 \cdot 10^5$	18
Kohlendioxyd	8, 2, 3	25.95	0.131	8.7	746	1964	0.990	1984	$151.4 \cdot 10^5$	27
		40.40	0.204	13.4	810	3063	0.990	3096	$151.8 \cdot 10^5$	
		59.40	0.299	19.8	830	4563	0.990	4610	$153.0 \cdot 10^5$	
Natriumpropionat	4, 5, 6	59.01	0.300	19.8	197	1076	0.943	1142	$38.0 \cdot 10^5$	20
Kohlendioxyd	4	40.07	0.207	15.8	134	588	0.928	634	$30.6 \cdot 10^5$	6
Äthylamin	5, 6	16.29	0.083	6.4	133	283	0.791	358	$43.1 \cdot 10^5$	15
Kohlendioxyd	5	39.71	0.202	13.3	279	1048	0.983	1067	$52.8 \cdot 10^5$	9
TMA-Reineckat	6	24.67	0.063	10.9	24	76	–	–	$12.0 \cdot 10^5$	2
TMA-Reineckat	7	24.98	0.064	8.4	9	23	–	–	$3.6 \cdot 10^5$	0.6
				berechnet aus den Gleich. (8) u. (10) für die C-Atome:				2	0	0
								3	$85.2 \cdot 10^5$	15

Tabelle XXIV

"Ricinin-Asparaginsäure-[3-^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg / cm^2	A Imp./Min.	$\bar{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\bar{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min. Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	52.12	0.263	20.5	311	1778	0.954	1864	$67.6 \cdot 10^5$	100
Ricininsäure	2-8	16.71	0.084	7.4	215	502	0.874	574	$68.4 \cdot 10^5$	94
		43.03	0.217	16.9	338	1589	0.945	1682	$77.6 \cdot 10^5$	
Dihydroricininsäure	2-8	26.73	0.134	9.0	301	811	0.893	908	$67.8 \cdot 10^5$	87
		35.31	0.178	11.8	316	1070	0.918	1550	$65.5 \cdot 10^5$	
Methanol	9	17.45	0.088	6.9	86	191	0.935	204	$23.2 \cdot 10^5$	5
		29.36	0.148	12.9	95	348	0.935	372	$25.2 \cdot 10^5$	
Silbercyanid	8	31.56	0.159	12.4	351	1239	0.925	1339	$84.2 \cdot 10^5$	16
Calciumoxalat	2, 3, 8	16.83	0.085	5.6	388	764	0.801	953	$112.0 \cdot 10^5$	39
		37.27	0.188	12.8	526	1865	0.909	2050	$109.1 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	8, 2, 3	24.39	0.123	9.6	286	812	0.957	849	$69.0 \cdot 10^5$	12
		25.96	0.131	10.2	272	813	0.957	849	$64.9 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	4	21.83	0.110	9.6	112	319	0.915	348	$31.7 \cdot 10^5$	6
Kohlendioxyd	5	27.11	0.137	10.7	21	65	0.914	71	$5.2 \cdot 10^5$	1
TMA-Reineckat	6	23.53	0.060	7.9	134	328	–	–	$54.7 \cdot 10^5$	10
TMA-Reineckat	7	34.14	0.087	11.4	44	145	–	–	$16.7 \cdot 10^5$	3
					berechnet mit den Gleich. (8) u. (10) für die C-Atome:			2	0	0
								3	$222.5 \cdot 10^5$	42

Tabelle XXV

"Ricinin-Acetat-[1-^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg/cm^2	A Imp./Min.	$\bar{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\bar{A}_K$ Imp./Min.	Imp./Min./Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	77.13	0.391	28.1	722	6534	0.963	6780	$174 \cdot 10^5$	100
Dihydroricininsäure	2-8	46.79	0.237	17.1	621	3424	0.766	4470	$189 \cdot 10^5$	95
Methanol	9	22.77	0.115	8.3	166	476	0.991	481	$43 \cdot 10^5$	3
Silbercyanid	8	31.70	0.161	11.6	1794	6838	0.918	7440	$464 \cdot 10^5$	33
Calciumoxalat	2, 3, 8	40.50	0.205	14.8	228	1092	0.763	1430	$70 \cdot 10^5$	10
		43.43	0.220	15.8	236	1212	0.766	1582	$72 \cdot 10^5$	
Natriumpropionat	4, 5, 6	20.43	0.104	7.4	438	1154	0.717	1610	$156 \cdot 10^5$	34
Kohlendioxyd	4	31.06	0.158	11.2	205	759	0.779	975	$62 \cdot 10^5$	4
		34.62	0.175	12.5	216	884	0.779	1134	$65 \cdot 10^5$	
Natriumacetat	5, 6	23.66	0.120	8.5	647	1965	0.730	2693	$225 \cdot 10^5$	32
Kohlendioxyd	5	42.32	0.214	15.4	227	1134	0.779	1457	$70 \cdot 10^5$	5
		42.68	0.216	15.5	240	1209	0.779	1500	$63 \cdot 10^5$	
TMA-Reineckat	6	28.26	0.072	10.2	629	2143	0.811	2643	$368 \cdot 10^5$	27
		29.28	0.075	10.6	667	2344	0.811	2890	$388 \cdot 10^5$	
		30.86	0.079	11.1	676	2490	0.811	3070	$319 \cdot 10^5$	
TMA-Reineckat	7	35.14	0.090	12.8	64	268	0.811	318	$37 \cdot 10^5$	3
		35.88	0.091	13.1	68	293	0.811	361	$40 \cdot 10^5$	
		45.07	0.115	16.4	65	345	0.811	425	$36 \cdot 10^5$	

Tabelle XXVI

"Ricinin-Natriumacetat-[2-^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	$\frac{mg}{cm^2}$	A $\frac{Imp.}{Min.}$	$\overset{\infty}{A}$ $\frac{Imp.}{Min.}$	Verdünnung (Divisor)	$\overset{\infty}{A}_k$ $\frac{Imp.}{Min.}$	$\frac{Imp./Min.}{Mol}$	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	73.88	0.374	26.9	1728	14970	0.962	15500	$416 \cdot 10^5$	100
Ricininsäure	2-8	76.73	0.389	27.9	2094	18849	0.964	19600	$503 \cdot 10^5$	106
Dihydroricininsäure	2-8	55.97	0.284	20.4	1971	12965	0.954	13580	$479 \cdot 10^5$	101
Methanol	9	34.37	0.174	12.5	827	3390	–	–	$195 \cdot 10^5$	6
		37.89	0.192	13.8	889	3998	–	–	$208 \cdot 10^5$	–
		50.34	0.255	18.3	889	5953	–	–	$206 \cdot 10^5$	–
Silbercyanid	8	26.53	0.134	9.7	1428	4650	0.950	4880	$383 \cdot 10^5$	12
Calciumoxalat	2, 3, 8	51.31	0.260	18.7	3434	20715	0.950	21200	$839 \cdot 10^5$	51
		53.01	0.269	19.3	3544	22069	0.951	23180	$864 \cdot 10^5$	
Natriumpropionat	4, 5, 6	33.77	0.171	12.3	826	3012	0.923	3260	$205 \cdot 10^5$	19
Kohlendioxyd	4	100.92	0.511	36.8	1135	13213	–	–	$258 \cdot 10^5$	8
Natriumacetat	5, 6	27.64	0.140	10.1	692	2335	0.906	2575	$184 \cdot 10^5$	11
Kohlendioxyd	5	35.96	0.183	13.1	1253	5364	–	–	$293 \cdot 10^5$	9
		57.02	0.289	20.8	1207	7910	–	–	$274 \cdot 10^5$	–
TMA-Reineckat	6	19.82	0.051	7.2	156	402	–	–	$80 \cdot 10^5$	2
TMA-Reineckat	7	16.84	0.042	6.0	441	1084	–	–	$256 \cdot 10^5$	8
		28.86	0.074	10.5	522	1829	–	–	$248 \cdot 10^5$	–
		29.45	0.075	10.7	504	1797	–	–	$240 \cdot 10^5$	–

Tabelle XXVII

"Ricinin-Formiat-[^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg / cm^2	A Imp./Min.	$\bar{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\bar{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min. / Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	48.48	0.245	17.7	1474	8411	0.943	8920	$364 \cdot 10^5$	100
		50.10	0.254	18.3	1389	8376	0.944	8870	$349 \cdot 10^5$	
Dihydroricininsäure	2-8	46.80	0.237	17.1	938	5171	0.940	5500	$232 \cdot 10^5$	56
Methanol	9	33.72	0.171	12.3	6620	26666	–	–	$1596 \cdot 10^5$	55
		40.25	0.204	14.7	6855	32736	–	–	$1605 \cdot 10^5$	
		51.12	0.259	18.6	6924	41619	–	–	$1607 \cdot 10^5$	
		59.28	0.300	21.6	7220	50264	–	–	$1675 \cdot 10^5$	
Silbercyanid	8	32.27	0.164	11.8	102	396	0.914	433	$26 \cdot 10^5$	0.9
Calciumoxalat	2, 3, 8	45.24	0.229	16.5	56	299	0.938	319	$14 \cdot 10^5$	1.0
Kohlendioxyd	4	25.89	0.131	9.4	125	399	–	–	$30 \cdot 10^5$	1.1
		40.76	0.207	14.9	131	632	–	–	$30 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	5	29.99	0.152	10.9	115	417	–	–	$27 \cdot 10^5$	1.0
		41.69	0.211	15.2	115	566	–	–	$27 \cdot 10^5$	
Methylamin · HCl	6	15.34	0.227	5.6	411	886	0.831	1066	$47 \cdot 10^5$	1.7
TMA-Reineckat	7	9.87	0.025	3.6	2026	3421	–	–	$1363 \cdot 10^5$	47
		20.35	0.052	7.4	2707	7106	–	–	$1372 \cdot 10^5$	
		24.99	0.064	9.1	2638	8165	–	–	$1316 \cdot 10^5$	

Tabelle XXVIII

"Ricinin-Kaliumcyanid-[^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg/cm²	A Imp./Min.	$\bar{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\bar{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min./Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	17.16	0.086	6.8	178	393	0.975	403	$46.7 \cdot 10^5$	100
		42.74	0.216	16.8	215	1003	0.980	1020	$47.3 \cdot 10^5$	
Ricininsäure	2-8	38.31	0.193	16.9	147	689	0.910	757	$39.3 \cdot 10^5$	73
Dihydroricininsäure	2-8	29.20	0.147	12.9	188	686	0.913	751	$51.1 \cdot 10^5$	95
Methanol	9	8.70	0.044	3.4	107	165	0.996	166	$37.7 \cdot 10^5$	9
		17.33	0.087	7.6	121	289	0.996	290	$33.2 \cdot 10^5$	
		33.35	0.168	13.1	147	545	0.996	547	$32.6 \cdot 10^5$	
		59.10	0.298	26.0	135	968	0.996	971	$32.6 \cdot 10^5$	
Silbercyanid	8	9.28	0.047	4.1	381	635	0.687	924	$192.3 \cdot 10^5$	51
Calciumoxalat	2, 3, 8	18.17	0.092	6.1	96	198	0.864	229	$24.9 \cdot 10^5$	13
		34.02	0.171	11.4	108	354	0.927	382	$22.4 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	8, 2, 3	36.03	0.181	12.1	368	1268	0.982	1290	$71.3 \cdot 10^5$	19
		55.64	0.280	18.6	380	1915	0.982	1950	$69.7 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	4	19.24	0.097	8.5	46	119	0.906	131	$13.5 \cdot 10^5$	4
Kohlendioxyd	5	16.84	0.085	7.4	59	138	0.891	155	$18.2 \cdot 10^5$	5
TMA-Reineckat	6	29.47	0.075	11.6	100	332	–	–	$44.2 \cdot 10^5$	12
TMA-Reineckat	7	38.96	0.099	13.1	65	240	–	–	$24.2 \cdot 10^5$	7
		69.58	0.177	23.3	84	540	–	–	$30.5 \cdot 10^5$	

Tabelle XXIX

"Ricinin-Bicarbonat-[^{14}C]"

untersuchte Verbindung	Atom Nr.	$BaCO_3$ auf plate mg	mMol	mg / cm^2	A Imp./Min.	$\mathring{A}$ Imp./Min.	Verdünnung (Divisor)	$\mathring{A}_k$ Imp./Min.	Imp./Min. / Mol	% d. Akt. d. Ric.
Ricinin	2-9	34.71	0.175	11.4	441	1442	0.917	1570	$89.7 \cdot 10^5$	100
		61.72	0.311	20.7	470	2682	0.936	2865	$83.0 \cdot 10^5$	
Ricininsäure	2-8	24.01	0.121	8.0	362	899	0.860	1046	$86.5 \cdot 10^5$	88
Methanol	9	28.24	0.144	11.1	99	317	0.998	318	$22.1 \cdot 10^5$	3
		44.54	0.224	14.9	116	484	0.998	485	$21.7 \cdot 10^5$	
Silbercyanid	8	16.66	0.084	5.6	277	542	0.826	655	$78.1 \cdot 10^5$	11
Calciumoxalat	2, 3, 8	19.54	0.098	6.5	243	524	0.868	604	$61.7 \cdot 10^5$	17
		33.20	0.167	11.1	266	854	0.923	925	$56.4 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	8, 2, 3	27.00	0.136	9.0	435	1180	0.980	1206	$88.6 \cdot 10^5$	13
		28.27	0.143	9.5	437	1229	0.980	1255	$87.9 \cdot 10^5$	
		32.33	0.163	10.8	440	1381	0.980	1410	$86.5 \cdot 10^5$	
Natriumpropionat	4, 5, 6	29.53	0.154	9.9	636	1861	0.913	2017	$131.8 \cdot 10^5$	55
		69.73	0.351	30.7	491	4152	0.964	4310	$123.0 \cdot 10^5$	
Kohlendioxyd	4	16.11	0.081	7.1	168	382	0.886	431	$53.2 \cdot 10^5$	8
Kohlendioxyd	5	8.01	0.040	3.5	84	131	0.772	170	$42.5 \cdot 10^5$	6
TMA-Reineckat	6	13.70	0.035	6.0	371	760	–	–	$217.0 \cdot 10^5$	32
TMA-Reineckat	7	47.54	0.121	18.7	30	105	–	–	$12.8 \cdot 10^5$	2
					berechnet mit den Gleich. (8) u. (10) für die C-Atome:			2	$131.2 \cdot 10^5$	19
								3	0	0

Schema II Ricininabbau

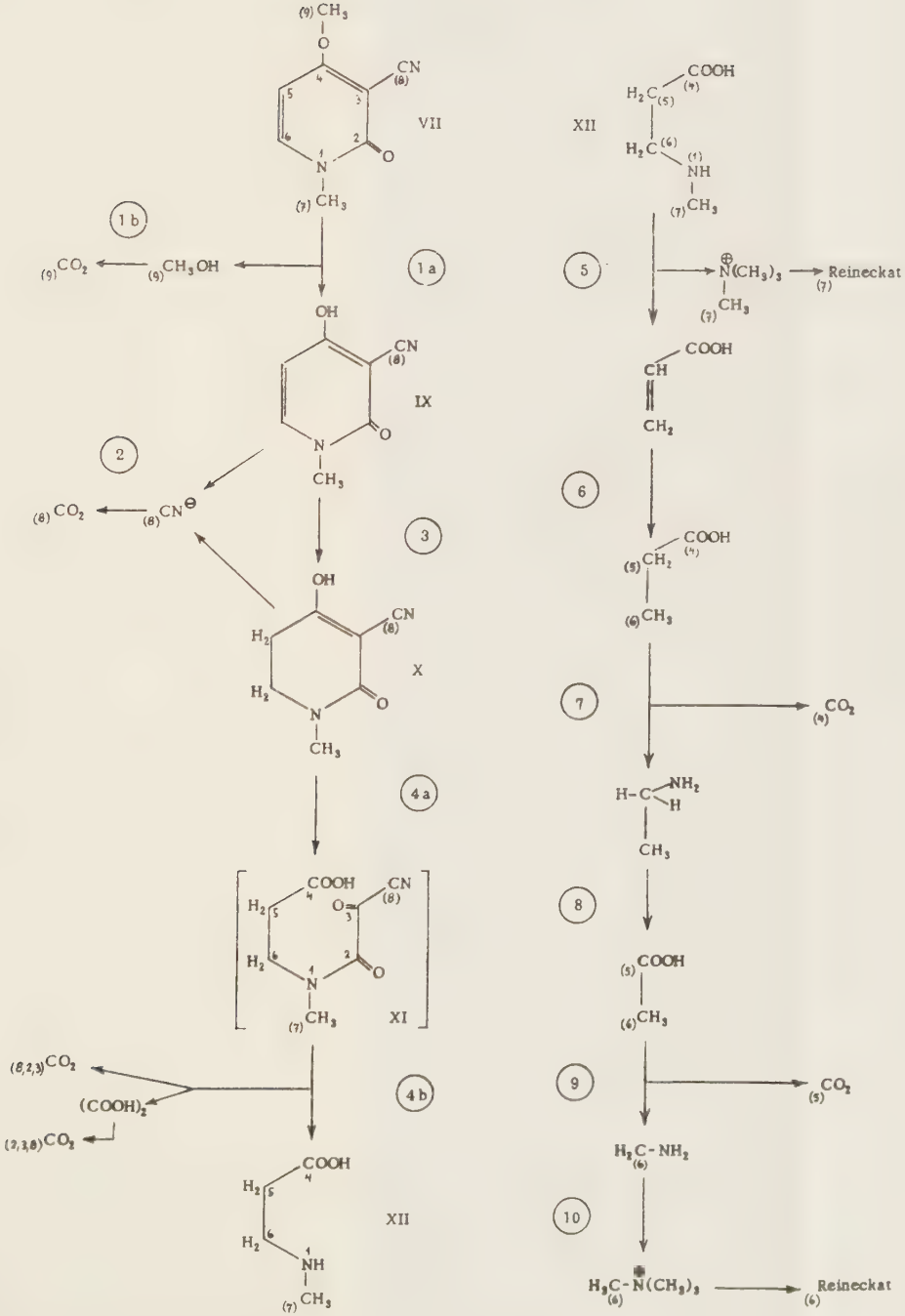
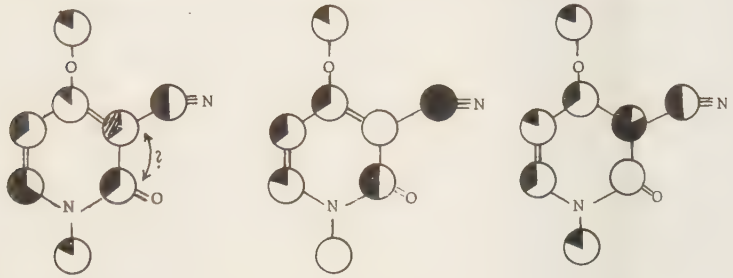
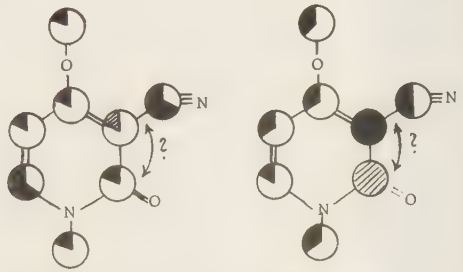


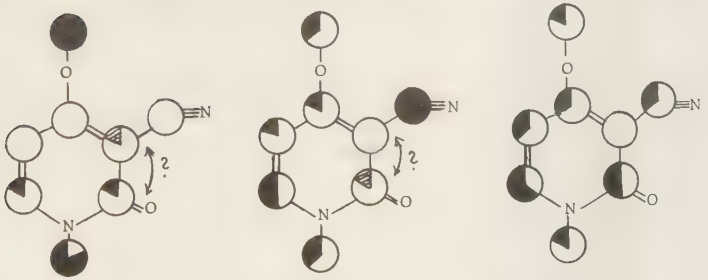
Abb. 7 Markierung des Ricinins nach Applikation von ^{14}C-markierten Verbindungen



VORSTUFE: Glu-[1-^{14}C] Glu-[2-^{14}C] Asp-[3-^{14}C]

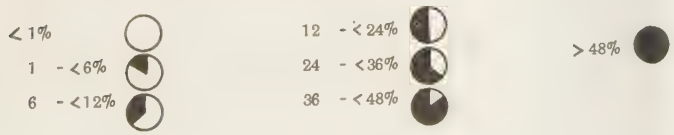


VORSTUFE: Acetat-[1-^{14}C] Acetat-[2-^{14}C]



VORSTUFE: Formiat-[^{14}C] Cyanid-[^{14}C] Bicarbonat-[^{14}C]

% der Radioaktivität des einzelnen C-Atoms an der des Ricininmoleküls:



Lebenslauf

Als Tochter des Hauptmanns im Generalstab Hans Boeckh-Behrens (gest. 1955 in russ. Kriegsgefangenschaft) und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Haenicke, wurde ich, Gerlinde Boeckh-Behrens, am 31.1.1932 in Berlin geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule in Berlin, Rauschen-Düne/Samland und Königsberg/Pr. besuchte ich mit Unterbrechung durch unsere Flucht aus Ostpreussen und Nachkriegsumstände 8 Jahre die höhere Schule in Königsberg/Pr., Borna/Sachsen und Marburg/Lahn. An der Staatl. Elisabeth-Schule Marburg/Lahn habe ich am 13.2.1951 die Reifeprüfung abgelegt.

Anschliessend arbeitete ich $\frac{1}{2}$ Jahr als Hilfskraft im Institut für Angew. Zoologie in Würzburg und begann dort im Wintersemester 1951/52 mit dem Studium der Naturwissenschaften (Zoologie, Botanik, Geologie, Chemie, Hauptfach Zoologie). 7 Semester studierte ich in Würzburg, 2 in Marburg, 2 war ich an der Universität in Tübingen und 2 an der Universität in München immatrikuliert. Im Mai 1956 begann ich am Max-Planck-Institut für Biochemie mit den Arbeiten zu meiner Dissertation.